



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“ESTUDO DA RESISTÊNCIA ÀS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA
GERAÇÃO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEM CANINA”

ANA SOFIA LEAL MARQUES OLIVEIRA SALAZAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Doutora Berta Maria Ferreira Fernandes São Braz
Dr. Hugo Miguel Sampainho Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias
Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr. Hugo Miguel Sampainho
Oliveira



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“ESTUDO DA RESISTÊNCIA ÀS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEM CANINA”

ANA SOFIA LEAL MARQUES OLIVEIRA SALAZAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Berta Maria Ferreira Fernandes São Braz

Dr. Hugo Miguel Sampainho Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias
Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr. Hugo Miguel Sampainho
Oliveira

2011

LISBOA

Aos meus pais e ao Estevão

Agradecimentos

O meu muito obrigado a todos aqueles que me apoiaram e me ajudaram durante o curso e a realização desta tese:

À minha orientadora Professora Maria Constança Pomba, pela sua compreensão, disponibilidade, paciência e ajuda dada durante a realização desta dissertação. Obrigada pelo conhecimento transmitido.

Ao meu co-orientador Dr. Hugo Oliveira e à Paula Oliveira por me terem recebido de braços abertos no seu hospital, pelo conhecimento e experiência partilhada e, não menos importante, pela amizade. Obrigada por me terem proporcionado este estágio, melhor seria impossível!

À equipa do HVT, em especial à Dra. Marta, Dra. Inês, Dra. Joana, Dra. Rita, Dra. Mariana, Teresinha e Lili, pelo companheirismo, pelos risos, pelo apoio e pela confiança. Por me terem ajudado a crescer como pessoa e como médica veterinária. Por gostarem tanto do meu bolo de chocolate!

À Dra. Natacha Couto e à Eng.^a Adriana Belas por toda a ajuda que me deram no laboratório e pela disponibilidade e paciência demonstrada face às minhas inúmeras dúvidas. Sem elas este trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos de sempre, em especial à Patrícia Oliveira, Inês Martins e Andreia Reis. Pelos conselhos, pelo apoio e encorajamento. Pelos mil cafés e gargalhadas partilhadas. Por estarem sempre presentes.

À Julieta Carmona, por ter sido a minha companheira durante estes cinco anos de curso, pela amizade inabalável.

Aos meus pais, por me terem incentivado a seguir o curso que sempre quis, pelos valores transmitidos e pelo amor e apoio incondicional.

A toda a minha família, em particular à minha avó Virgínia Leal, às minhas tias Ana e Guida e aos meus tios Nuno e Carlos, por me apoiarem em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao Estevão, pelas críticas construtivas, pelas discussões noite dentro e pelas respostas as minhas muitas dúvidas informáticas. Por acreditar sempre em mim e por me ter tornado uma pessoa mais feliz. Amo-te!

À Amy, por ser a gata mais fofinha do mundo.

E, por último, à Pfizer, por ter financiado parcialmente este estudo.

RESUMO - ESTUDO DA RESISTÊNCIA ÀS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE ORIGEM CANINA

A resistência a antibióticos em *Escherichia coli* é um problema crescente a nível global, em humanos e animais. *Antibióticos criticamente importantes* (CI) são aqueles que vão de encontro aos critérios da OMS 1 (única ou uma das poucas terapêuticas disponíveis para tratar infecções graves em humanos) e 2 (antibacterianos utilizados para tratar doenças provocadas por microrganismos que podem ser transmissíveis por fontes não-humanas ou doenças causadas por organismos que podem adquirir genes de resistência de fontes não-humanas). O objectivo deste estudo foi de avaliar taxa de colonização com *E. coli* resistente a antibióticos em cães saudáveis, particularmente às cefalosporinas de terceira geração. Foram isoladas 135 *E. coli* de canídeos (n=151) no período de Novembro de 2010 a Janeiro de 2011, no Hospital Veterinário da Tapada. Os cães incluídos no estudo eram saudáveis e não tinham história de consumo de antibióticos no mês anterior à colheita da amostra. As zaragatoas foram inoculadas em água peptonada e incubadas 18 horas, sendo depois semeadas em agar MacConkey com um disco de cefotaxima 30µg. Foram seleccionadas colónias típicas de *E. coli*, preferencialmente as que cresciam junto ao disco, e identificadas pelo método de PCR *gadA/B*, específico para *E. coli*. Os testes de susceptibilidade e a sua interpretação foram realizados de acordo com os critérios CLSI. Existiam 51% isolados totalmente susceptíveis, e 49% tinham pelo menos uma resistência adquirida. A prevalência de resistência da *E. coli* à amoxicilina (Aml) foi de 43%, ao trimetoprim/sulfametoxazol (Sxt) 30%, à cefoxitina (Fox) 25%, à amoxicilina/ácido clavulânico (Amc) 24%, à cefotaxima (Ctx) 18%, à enrofloxacina (Enr) 16% e à gentamicina (Cn) 4%. Multirresistência, definida como resistência a três ou mais classes de antibióticos, estava presente em 23 isolados (17%). Dentro dos isolados multirresistentes, existia resistência a classes de antibióticos criticamente importantes: 17 isolados eram resistentes à cefotaxima e 21 à enrofloxacina. Os perfis mais frequentes de multirresistência eram Amc-Aml-Ctx-Enr-Fox-Sxt (n=9) e Aml-Ctx-Enr-Sxt (n=3). Entre as estirpes de *E. coli*, 3,7% (n=5) eram produtoras de ESBL (“Extended Spectrum Beta-lactamases”), possuindo o gene *bla_{CTX-M}*. Neste estudo foi demonstrado que existe uma frequência elevada de resistência em estirpes de *E. coli* isoladas de cães saudáveis. Estes resultados mostram que estirpes de *E. coli* multirresistentes e produtoras de ESBL estão a aumentar e podem comprometer a eficácia terapêutica. Além disso, a resistência às classes de antibióticos criticamente importantes é relevante. É da máxima importância preservar a utilidade destes agentes antibacterianos, já que a resistência teria um impacto relevante na saúde humana devido ao contacto próximo entre animais de companhia e os seus donos.

Palavras-chave: Cefalosporinas de terceira geração, resistência, ESBL, cães saudáveis

ABSTRACT – STUDY OF THIRD GENERATION CEPHALOSPORIN'S RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES OF CANINE ORIGIN.

Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* is an increasing global problem in humans and animals. *Critically important* (CI) antimicrobials are those that met WHO criteria 1 (Sole therapy or one of few alternatives to treat serious human disease) and 2 (Antibacterial used to treat diseases caused by organisms that may be transmitted via non-human sources or diseases caused by organisms that may acquire resistance genes from non-human sources). The aim of this study was to determine the rate of colonization with antimicrobial resistant *E. coli* particularly to 3rd generation cephalosporins (3GC) among healthy dogs. One-hundred and thirty-five *E. coli* were isolated from dogs ($n=151$), between November 2010 and January 2011, at Hospital Veterinário da Tapada. The dogs included in the study were healthy with no history of antimicrobial consumption in the month before they were sampled. Swabs were inoculated in peptone water and incubated 18h and then sub-cultured onto MacConkey agar with a 30 μ g cefotaxime disk. Colonies typical of *E. coli* were selected preferentially from around the disk and identified by specific *gadA/B E. coli* gene PCR. Susceptibility testing and interpretation was performed using disc diffusion method according to CLSI guidelines. Full susceptible isolates were 51% and 49% had at least one acquired resistance. The resistance rate of *E. coli* for amoxicillin (Aml) was 43%, 30% trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt), 25% cefoxitin (Fox), 24%, amoxicillin/clavulanate (Amc), 18% cefotaxime (Ctx), 16% enrofloxacin (Enr), and 4% gentamicin (Cn). Multidrug-resistance (MDR) defined by resistance to 3 or more antimicrobial classes was present in 23 isolates (17%). Within MDR isolates, resistance to CI antimicrobial classes was present in 17 isolates to 3GC and 21 to enrofloxacin. The most frequent multiresistance profiles were AmlR-AmcR-EnrR-SxtR-CtxR-FoxR ($n=9$) and Aml-Ctx-Enr-Sxt ($n=3$). Among *E. coli* strains, 3,7% ($n=5$) were extended-spectrum- β -lactamases (ESBL) producers, harbouring the *bla*_{CTX-M} gene. In this study we showed a high frequency of resistance in veterinary *E. coli* strains from healthy dogs. Our results demonstrated that multidrug-resistant *E. coli* and ESBL producing strains are increasing and may compromise effective therapeutic options. Furthermore, resistance to CI antimicrobial classes is relevant. It is of prime importance that the utility of such antibacterial agents should be preserved, as resistance would have an important impact on human health due to the close and direct contact between pets and owners.

Key-words: Third-generation cephalosporins, resistance, ESBL, healthy dogs

Índice

1. Introdução	1
1.1 Animais de Companhia	4
1.2 Cefalosporinas	5
1.3 Resistência aos Antibióticos β -lactâmicos:	7
1.4 ESBLs:	12
1.5 <i>Escherichia coli</i> :	15
2. Objectivos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Colheita das amostras	19
3.2 Isolamento de <i>Escherichia coli</i> comensal	19
3.3 Identificação de isolados de <i>Escherichia coli</i> comensal	20
3.3.1 Extracção de ADN	20
3.3.2 Identificação por PCR	20
3.4 Susceptibilidade aos antibióticos	21
3.5 PCR <i>multiplex</i> β -lactamases e PCR CTX-M	22
4. Resultados	24
5. Discussão	31
6. Conclusão	34
7. Bibliografia	35
Anexo I - Actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular no Hospital Veterinário da Tapada, entre Outubro e Março de 2010/2011	42
Anexo II - Resumo apresentado no XXI Congresso ECVIM-CA 2011, Sevilha, Espanha.	50
Anexo III - Aprovação do resumo a apresentar no XXI Congresso ECVIM-CA 2011, Sevilha, Espanha	51
Anexo IV - <i>Proceedings</i> do XXI Congresso ECVIM-CA 2011, Sevilha, Espanha	52
Anexo V - Inquérito feito aos donos sobre as características dos seus animais de companhia.	54
Anexo VI - Respostas ao inquérito: Caracterização demográfica e meio ambiente.	55
Anexo VII - Respostas ao inquérito: Motivo da consulta, antibioterapia prévia e história de internamento.	60
Anexo VIII - Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de <i>E. coli</i>	65

Índice de Figuras:

Figura 1: Desenvolvimento de novas classes de antibióticos ao longo do tempo. Adaptado de Norrby et al.(2005)..	2
Figura 2: Estrutura do núcleo das cefalosporinas. Adaptado de Chambers (2004).....	5
Figura 3: Estrutura de ESBLs representativas. Adaptado de Perez et al. (2007).	10
Figura 4: Protocolo laboratorial de isolamento de <i>E. coli</i> a partir de zaragatoas de fezes de cão.....	19
Figura 5: Sequência genómica do primer GADAB <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizado no PCR para identificação dos isolados de <i>E. coli</i> segundo McDaniels et al (1996).	21
Figura 6: Colónias em agar MacConkey compatíveis com <i>E. coli</i> e colónias em meio CLED compatíveis com <i>Klebsiella spp.</i>	24
Figura 7: Observação de sinergias pelo DDST, entre os discos de cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico, em placas de TSA de isolados de <i>E. coli</i>	27

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Principal acção das diferentes gerações de cefalosporinas. Adaptado de Levison (2009).	6
Tabela 2: Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos. Tradução livre de Li, Mehrotra, Ghimire & Adewoye (2007).	8
Tabela 3: Presença de <i>E. coli</i> produtora de ESBL em cães e gatos por ordem cronológica de data de publicação. Adaptado e traduzido de Ewers et al. (2011).	14
Tabela 4: Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos.	22
Tabela 5: Lista de <i>primers</i> utilizados no PCR <i>multiplex</i> b-lactamases e PCR CTX-M	23
Tabela 6: Prevalência (%) de resistência e susceptibilidade intermédia aos antibióticos testados, observada em <i>E. coli</i> de origem canina.	26
Tabela 7: Perfis de resistência observados nos isolados de <i>Escherichia coli</i> pelo método de difusão de discos.	27
Tabela 8: Amostras positivas ao PCR CTX-M para pesquisa de genes codificadores de ESBLs produtoras de CTX-M e perfis de resistência associados.	28
Tabela 9: Resultados do PCR <i>Multiplex</i> β -lactamases para pesquisa de genes codificadores de resistência a antibióticos β -lactâmicos, perfis de resistência associados e tratamento antibiótico no ano anterior.	28
Tabela 10: Perfis de resistência dos isolados negativos aos PCR <i>Multiplex</i> β -lactamases e PCR CTX-M.	30

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Percentagem de cada sexo entre os animais em estudo	24
Gráfico 2: Percentagem de animais que vivem numa associação, com um criador ou com um dono particular.	25
Gráfico 3: Distribuição geográfica dos animais por Concelho.....	25
Gráfico 4: Frequência absoluta de isolados de <i>E. coli</i> com resistência a 1-7 antibióticos pelo método de difusão em disco.	26

Abreviaturas

ADN / DNA – Ácido desoxirribonucleico / “Desoxyribonucleic acid”

Amc – Amoxicilina / Ácido Clavulânico

Aml – Amoxicilina

CI – Criticamente Importantes / “Critically important”

CLSI – “Clinical Laboratories Standards Institute”

CN – Gentamicina

Ctx – Cefotaxima

DDST – “Double-disk synergy test”

dNTP – “Deoxynucleotide triphosphates” / Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

ENR – Enrofloxacin

ESBL – “Extended Spectrum Beta-lactamases”

ExPEC – “Extraintestinal pathogenic *E. coli*” / *E. coli* patogénica extraintestinal

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

FVE – “Federation of Veterinarians of Europe”

Fox – Cefoxitina

HVT – Hospital Veterinário da Tapada

I – Suscetibilidade intermédia

LRAB – Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas

MDR – “Multidrug-resistance”

MLST – “Multilocus Sequence Typing”

MRSA – “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”

OIE – “World Organisation for Animal Health”

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde / “World Health Organization”

pb – Pares de Bases

PLPs – Proteínas de ligação à penicilina

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

R – Resistente

Sxt – Trimetoprim/sulfametoxazol

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

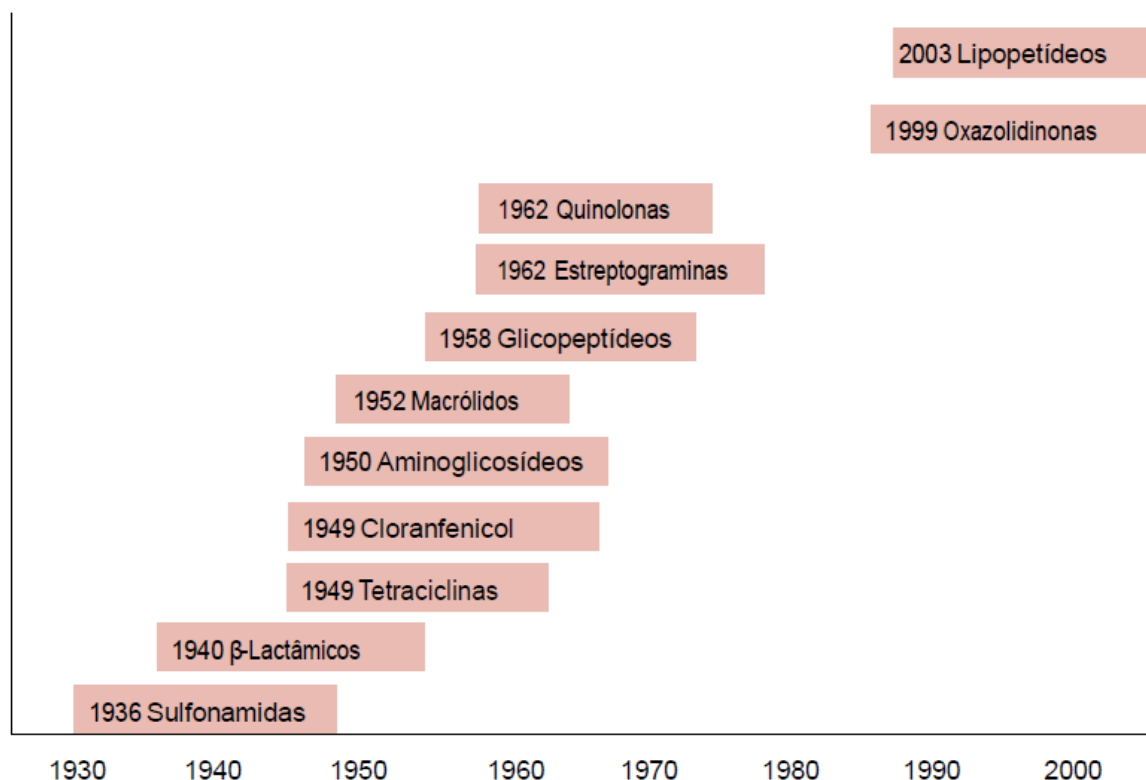
1. Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos é cada vez mais preocupante a nível global, constituindo um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2011), estima-se que na União Europeia morrem mais de 25000 pessoas por ano devido a infecção por bactérias multirresistentes.

Segundo French (2005), a resistência antimicrobiana é uma resposta evolutiva inevitável ao uso de antibióticos. Actualmente os antibióticos são usados a nível mundial, na medicina humana, medicina veterinária e produção animal. A forma como o seu uso é encarado está ligada a factores socioeconómicos e comportamentais, que englobam a formação, educação e ética dos profissionais de saúde, a educação da população, a qualidade dos antibióticos, condições de higiene e a legislação e monitorização adoptada por cada país (Okeke, Lamikanra & Edelman, 1999; Schjørring & Krogfelt, 2010).

O aumento das resistências afecta a eficácia do tratamento antibiótico, trazendo consequências a nível clínico (mortalidade e morbilidade) e económico (custos de hospitalização e terapêutica). A instituição de uma terapia adequada pode ser atrasada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, e a escolha do antibiótico é mais limitada quanto mais resistências apresentar a bactéria. Em países em desenvolvimento a resistência a um ou dois antibióticos pode significar resistência a todas as opções terapêuticas disponíveis (French, 2005). Outro factor agravante na problemática da resistência bacteriana é o facto do ritmo de descoberta de novos antibióticos ter diminuído drasticamente (Figura 1). Desde 1962 só foram descobertas duas novas classes de antibiótico e a partir daí todos os novos antibióticos derivam de classes já existentes, uma tendência que tende a agravar-se no futuro, pois o desenvolvimento de antibióticos não constitui um mercado atractivo para as grandes farmacêuticas (Wenzel, 2004). Desenvolver um novo antibiótico leva cerca de 10 a 15 anos e implica um alto investimento num produto que é apenas usado em curtos períodos de tempo e que enfrenta vários regulamentos que condicionam o seu uso, devendo ser adoptadas medidas que contrariem esta tendência, como incentivos económicos e desburocratização (Jansen, van der Bruggen & Verhoef, 2006). Além disso, novos antibióticos são geralmente considerados de última linha e usados em relativamente poucos casos (Norrby, Nord & Finch, 2005).

Figura 1: Desenvolvimento de novas classes de antibióticos ao longo do tempo. Adaptado de Norrby et al. (2005).



O panorama agrava-se no caso dos antibióticos desenvolvidos para medicina veterinária, devido à preocupação com o uso de moléculas semelhantes às usadas em medicina humana e às consequências que isso teve no panorama político e legislativo Europeu e Americano, em relação ao seu uso em animais de produção. Os antimicrobianos acabam por competir com outros produtos veterinários, dentro de cada farmacêutica, por financiamento para pesquisa e desenvolvimento, e muitas vezes só as doenças de animais de produção com grande impacto a nível mundial representam investimentos seguros, em detrimento de outras áreas (Shryock & Richwine, 2010).

O papel do uso de antibióticos em animais de produção na problemática da resistência a antibióticos tem sido alvo de muito destaque (van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Em 2001 a União Europeia banuiu o uso de antibióticos similares aos usados em medicina humana como promotores de crescimento e em 2006 os países membros acordaram o fim do uso de qualquer antibiótico como promotor de crescimento, mas estes continuam a ser utilizados em vários países (Angulo, Baker, Olsen, Anderson & Barrett, 2004). Várias organizações europeias como a European Food Safety Authority (EFSA) em associação com a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) desenvolveram programas de

monitorização para aplicação nos diferentes países europeus com o objectivo de controlar a prevalência de bactérias resistentes quer zoonóticas como a *Salmonella* spp., quer indicadoras como a *Escherichia coli* comensal (Centeno, 2010).

Os animais de companhia são uma potencial fonte de transmissão de bactérias resistentes que tem sido alvo de pouco interesse quando comparados com os animais de produção, uma tendência que tem sido invertida recentemente devido ao maior número de estudos que mostram animais de companhia infectados ou colonizados com organismos multirresistentes (Murphy et al., 2009) e em alguns países Europeus, como a Dinamarca (DANMAP, 2009) e Suécia (SVARM, 2010), os animais de companhia já são considerados nos programas de monitorização de consumo de antibióticos.

Várias organizações internacionais elaboraram normas sobre o uso prudente de antibióticos em medicina veterinária, como a OMS, World Organisation for Animal Health (OIE), World Veterinary Association (WVA), American Veterinary Medical Association (AVMA) e Federation of Veterinarians of Europe (FVE) (Shryock & Richwine, 2010).

As normas pretendem constituir uma linha orientadora que optimize o uso de antibióticos, e não ser interpretadas como dogmas que se sobrepõem ao discernimento médico, podendo por em causa a saúde e o bem-estar animal. Assim, a escolha do antibiótico deve ter em conta vários princípios, sendo os principais (Passantino, 2007):

- O uso de antibióticos deve ter em conta a avaliação e diagnóstico feito pelo médico veterinário;
- Deve dar-se prioridade a antibióticos aprovados para a espécie em causa;
- Quando não existe um antibiótico aprovado que satisfaça as indicações terapêuticas e/ou espécie em causa, o antibiótico escolhido deve idealmente ser escolhido com base em estudos de eficácia; deve-se evitar o uso *off-label* indiscriminado;
- Determinar sempre que possível a susceptibilidade do microrganismo suspeito;
- Ter em conta parâmetros farmacocinéticos para escolher um antibiótico que atinja o local da infecção;
- Ter em conta a imunocompetência do paciente;
- Escolher um antibiótico com espectro de acção adequado, preferindo antibióticos com espectro de acção mais estreito;
- Avaliar bem as situações em que é necessário recorrer a combinações de antibióticos.

O contributo dos médicos veterinários é necessário para a manutenção da eficácia e utilidade dos fármacos antimicrobianos em medicina humana e veterinária. Se é expectável que o

prognóstico do animal melhora após administração de determinado antibiótico, e este está inserido numa boa relação veterinário-paciente-cliente, o veterinário deve oferecer o antibiótico como opção terapêutica. No entanto, em determinadas situações, as consequências de perder a utilidade de um antibiótico que é usado como último recurso em humanos e animais com infecções por bactérias resistentes pode ser inaceitável na perspectiva da saúde pública, e os veterinários podem confrontar-se com um dilema ético entre o dever que tem com o seu paciente e com a sociedade (Passantino, 2007).

1.1 Animais de Companhia

Num estudo desenvolvido com o objectivo de avaliar a relação entre donos e animais de companhia e de que forma é que essa relação influenciava os cuidados veterinários proporcionados aos animais, 43% dos donos de cães concordaram fortemente com a afirmação “Considero o meu animal um filho”, e 58% sentem a falta do seu animal quando está fora de casa (Lue, Pantenburg & Crawford, 2008). Actualmente os cães partilham a casa com os donos e estão muitas vezes em contacto próximo através de actividades como dormir, brincar, comer, e limpar dejectos, e demonstrações de afecto como festas e abraços (Westgarth et al., 2008). Este contacto próximo com humanos constitui um factor crítico e único na problemática da resistência bacteriana em animais, pois cria a oportunidade para a transmissão interespecie de bactérias, nomeadamente bactérias resistentes (Weese, 2008).

No estudo de Lue et al. (2008), 80% dos donos de cães concordaram com a afirmação "gastaria o dinheiro necessário para manter os meus animais saudáveis". Esta preocupação com o bem-estar animal e a maior disponibilidade económica por parte dos donos pode levar a um certo facilitismo em relação à prescrição de antibióticos quando existe dúvida no diagnóstico ou risco de infecções secundárias, particularmente antibióticos de largo espectro aprovados para medicina humana (Guardabassi, Schwarz & Lloyd, 2004). O aumento do uso de antibióticos de largo espectro para evitar falha no tratamento influencia a presença e o nível de multiresistência das bactérias (Schjørring & Krogfelt, 2010). Na prática clínica veterinária nem sempre se recorre à identificação bacteriana nem a testes de sensibilidade a antibióticos (TSA), havendo selecção empírica dos antimicrobianos (Guardabassi et al., 2004).

A maioria dos estudos realizados sobre transmissão de bactérias entre animais de companhia e humanos debruça-se sobre bactérias zoonóticas, como a *Salmonella* (Sato, Mori, Koyama & Nagase, 2000) e *Campylobacter jejuni* (Wolfs et al., 2001). Em relação à transmissão de

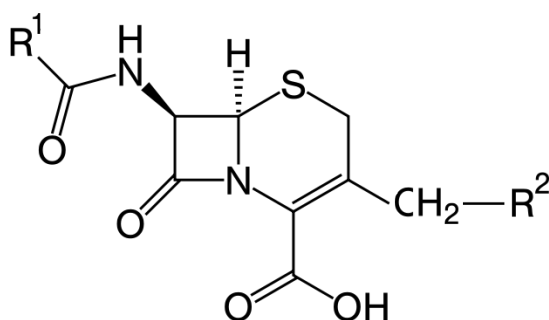
outras bactérias patogénicas, a maioria da informação refere-se ao *Staphylococcus pseudintermedius*, em cães e gatos: donos de cães com piodermite profunda são frequentemente portadores da mesma estirpe que os seus cães (Guardabassi, Loeber & Jacobson, 2004), podendo o *S. pseudintermedius* ser resistente a vários antibióticos (Couto, Pomba, Moodley & Guardabassi, 2011).

É necessário dar a atenção devida aos animais de companhia como potencial fonte de transmissão de resistência bacteriana a humanos, e proceder à recolha de informação que possa permitir compreender a epidemiologia da resistência antimicrobiana em animais e humanos (Lloyd, 2007).

1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos que possuem um núcleo de ácido 7-aminocefalosporânico, semelhante ao da penicilina (Figura 2). A actividade antimicrobiana intrínseca das cefalosporinas naturais é baixa, mas a junção de grupos R1 e R2 confere uma boa actividade terapêutica e baixa toxicidade. Apresentam uma boa difusão nos diferentes tecidos do organismo e, na sua maioria, são eliminadas por via renal (Chambers, 2004).

Figura 2: Estrutura do núcleo das cefalosporinas. Adaptado de Chambers (2004).



As cefalosporinas, assim como todos os antibióticos β -lactâmicos, inibem o crescimento bacteriano interferindo num passo específico da síntese da parede celular bacteriana. A parede celular é uma membrana externa rígida, que rodeia a membrana celular, mantendo a forma da célula e impedindo a lise celular devido à elevada pressão osmótica. É uma estrutura que não existe nas células animais, composta por peptoglicano, um polímero reticulado complexo de polissacáridos e polipéptidos. O polissacárido contém N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico. Ligado a este último está um péptido composto por cinco aminoácidos, que termina em D-alanil-D-alanina. As proteínas de ligação à penicilina (PLPs) são enzimas bacterianas que catalisam uma reacção de transpeptidação, que remove a terminação alanina,

formando uma ligação com um pentapéptido e assim conferindo rigidez estrutural à parede. Os β -lactâmicos são análogos estruturais do substrato D-Ala-D-Ala e ligam-se covalentemente às PLPs. Quando o antibiótico se liga às PLPs, a reacção de transpeptidação é inibida, a síntese de peptoglicano é bloqueada e a célula morre. Assim, as cefalosporinas têm actividade bactericida quando as células estão em crescimento e a sintetizar a parede celular (Chambers, 2004).

De uma maneira geral, as cefalosporinas têm acção contra bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas e algumas anaeróbias, mas existem diferenças substanciais entre as várias cefalosporinas em relação ao seu espectro e actividade bactericida (Tabela 1) (Maddison, Watson & Elliott, 2008).

Tabela 1: Principal acção das diferentes gerações de cefalosporinas. Adaptado de Levison (2009).

Geração	Espectro de acção
1 ^a	Cocos Gram-positivos
2 ^a	Cocos Gram-positivos, alguns bastonetes Gram-negativos
3 ^a	Cocos Gram-positivos, <i>Haemophilus influenzae</i> e algumas Enterobacteriaceae (por exemplo, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>) que não produzem ESBLs e β -lactamases AmpC.
4 ^a	Cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos (incluindo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> e algumas <i>E. coli</i> produtoras de ESBL e Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases AmpC)
5 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina

ESBL – β -lactamases de espectro alargado / “Extended Spectrum β -lactamases”

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina / “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”

As cefalosporinas de 1^a geração são essencialmente activas sobre bactérias Gram-positivas com actividade limitada sobre algumas Gram-negativas. À medida que se avança nas diferentes gerações, o espectro para Gram-negativas amplia-se mas perde-se alguma actividade para as Gram-positivas. As cefalosporinas de 3^a geração são, em regra, menos activas *in vitro* contra estafilococos susceptíveis do que as cefalosporinas de 1^a geração. Por outro lado, apresentam um espectro de actividade muito mais alargado para bactérias Gram-negativas do que as cefalosporinas de 1^a e 2^a geração: têm acção contra as Gram-negativas susceptíveis às cefalosporinas de 1^a e 2^a geração e contra outras estirpes de Gram-negativas consideradas multirresistentes (Prescott, Harley & Klein, 2005). O uso de antibióticos da

classe das cefalosporinas em animais, particularmente das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, foi alvo de maior atenção uma vez que esta classe é classificada como “criticamente importante” (CI) pela OMS. Além destas cefalosporinas, também as quinolonas e os macrólidos são considerados antibióticos CI, pois cumprem os seguintes critérios: o princípio activo ou classe de antibióticos é a única terapia possível ou uma das poucas alternativas para o tratamento de infecções graves em humanos, e o antimicrobiano ou classe é utilizado para o tratamento de doenças causadas por microrganismos transmitidos através de fontes não humanas ou doenças causadas por microrganismos que podem adquirir genes de resistência a partir de fontes não humanas (FAO/WHO/OIE, 2008).

Em Portugal, a única cefalosporina de largo espectro autorizada para uso em cães e gatos é a cefovecina (Convenia[®], laboratórios Pfizer). Em cães, o seu uso está indicado para o tratamento de infecções da pele e tecidos moles associados a *S. pseudintermedius*, *Streptococci* β -hemolíticos, *E. coli* e/ou *Pasteurella multocida*, e para o tratamento de infecções do tracto urinário associadas a *E. coli* e/ou *Proteus* spp. Para uso em animais de produção estão autorizadas várias cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, em Portugal: cefoperazona, ceftiofur e cefquinoma (Apifarma, 2011).

As cefalosporinas de 3ª geração autorizadas para uso em medicina humana, em Portugal, são o cefditoreno, cefetamet, cefixima, cefodizima sódica, cefotaxima, ceftadizima e ceftriaxona. Quase todas elas, à excepção da ceftadizima e cefetamet, podem ser adquiridas em farmácia comunitária (Infarmed, 2010) o que torna possível o seu uso *off-label* na prática clínica da medicina veterinária, cabendo ao médico veterinário de pequenos animais utilizar os antibióticos de forma responsável.

1.3 Resistência aos Antibióticos β -lactâmicos

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos ocorre por diferentes mecanismos: inactivação do antibiótico por β -lactamases, alteração das PLPs com diminuição da afinidade para o antibiótico, e comprometimento da penetração do antibiótico até conseguir chegar à PLP por diminuição das porinas e presença de bombas de efluxo que removem o antibiótico da célula antes de este atingir o local da acção (Chambers, 2004).

Tabela 2: Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos. Tradução livre de Li, Mehrotra, Ghimire & Adewoye (2007).

Localização do gene	Determinante genético	Mecanismo (s)	Fenótipo de resistência
Cromossoma ou plasmídeo	Genes codificadores de β -lactamases	Inativação enzimática	β -lactâmicos (o tipo e o nível de expressão da β -lactamase determina resistência a β -lactâmicos individuais)
Cromossoma	Genes codificadores de PLPs	Alterações no local de ligação	β -lactâmicos
Cromossoma	Genes codificadores das bombas de efluxo	Efluxo activo por sobre expressão das bombas de efluxo	Múltiplos antibióticos, incluindo β -lactâmicos
Cromossoma	Genes codificadores de porinas	Diminuição do influxo por perda de porinas	Múltiplos antibióticos, incluindo β -lactâmicos
Cromossoma	Gene <i>oprD</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que codifica uma proteína de canal específica	Diminuição do influxo por perda de OprD	Carbapenemos

Os dois principais impulsionadores do desenvolvimento e aumento de resistência bacteriana são a pressão selectiva exercida pelos antibióticos na microbiota bacteriana, que permite uma selecção preferencial das bactérias resistentes por vantagem competitiva e a disseminação de genes de resistência entre as bactérias, e a transmissão de microrganismos resistentes através de contacto directo, superfícies contaminadas, água e comida (WHO, 2011).

As resistências podem surgir ou ser adquiridas a partir de mutações a nível cromossómico, plasmídeos, transferência de genes entre elementos genéticos no interior da bactéria, e transferência de genes entre bactérias (von Baum & Marre, 2005).

Os plasmídeos são elementos genéticos extra-cromossómicos que estão livres no citoplasma, replicam-se por si próprios e podem ser constituídos por um até mais de 500 genes. Quando transportam genes de resistência a antibióticos são denominados plasmídeos R (Rang, Dale, Ritter & Moore, 2004).

Os transposições são segmentos de ADN que podem ser transferidos de um plasmídeo para outro, de um plasmídeo para um cromossoma ou vice-versa, independentemente do mecanismo normal de recombinação genética homologa. Podem transportar um ou mais genes de resistência e passar para outra bactéria ao mesmo tempo que um plasmídeo, e mesmo que o plasmídeo não se consiga replicar no novo hospedeiro, o transposão pode transferir genes para o cromossoma desse hospedeiro ou para os seus plasmídeos nativos (Rang et al., 2004).

O integrão é um elemento genético que possui um sítio, *attI*, no qual pode ser integrado ADN adicional na forma de cassete de genes, por recombinação com localização específica, e que codifica uma integrase que media este evento. Cassetes de genes são elementos genéticos que podem existir como moléculas de ADN circular livre e não-replicante, mas que geralmente são encontrados como sequências lineares que fazem parte duma molécula de ADN maior, como um plasmídeo ou cromossoma bacteriano. Geralmente só contêm um gene e uma pequena sequência que funciona como local de recombinação específico (Bennett, 1999).

O sistema transposão/integrão/cassete de múltipla resistência permite uma transferência rápida e eficiente de resistência a múltiplos fármacos entre elementos genéticos no interior da bactéria, e entre bactérias por intermédio de plasmídeos (Rang et al., 2004).

A transferência de genes de resistência entre bactérias pode dar-se por conjugação, transdução e transformação (Hawkey, 2008). A conjugação em bactérias Gram-negativas é um processo replicativo em que a bactéria receptora adquire uma nova cópia do plasmídeo transferido e que é mais significativo em populações bacterianas de grande densidade, como acontece no tracto intestinal (Rang et al., 2004). Na transdução o ADN do plasmídeo é envolvido num bacteriófago e transferido para uma nova estirpe. A transformação ocorre em algumas bactérias quando, em condições naturais, captam ADN livre do ambiente e incorporam-no no seu genoma ou plasmídeos (Hawkey, 2008).

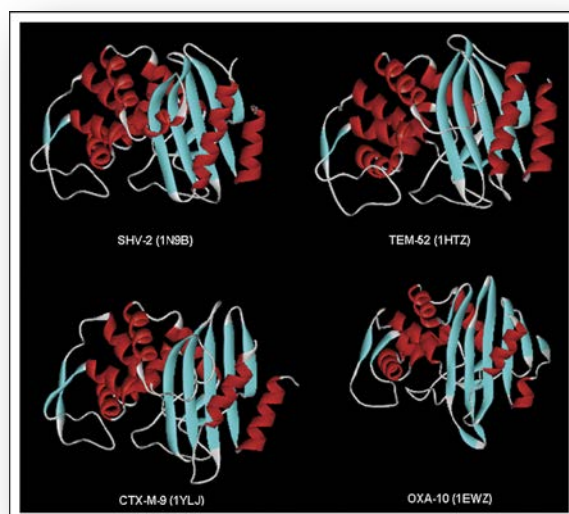
A resistência aos antibióticos β -lactâmicos surgiu antes de ser desenvolvido o primeiro antibiótico β -lactâmico: a primeira β -lactamase foi identificada em *E. coli* antes de a penicilina estar disponível para uso médico (Bradford, 2001).

As β -lactamases são enzimas que inactivam os β -lactâmicos hidrolisando o anel β -lactâmico, e consistem no principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos nas bactérias Gram-negativas (Bush, 2010). Os genes que codificam estas enzimas muitas vezes coexistem com outros determinantes de resistência e podem estar associados a transposições ou integrões, aumentando a possibilidade das bactérias adquirirem resistências a outras classes de

antibióticos e de disseminarem determinantes de resistência a outras bactérias (Li et al., 2007).

As β -lactamases são dos grupos mais heterogêneos de enzimas que conferem resistência, consistindo em proteínas globulares compostas por α -hélices e folhas β -pregueadas (Figura 3) e partilhando uma topologia geral comum, apesar de existir uma variabilidade significativa nas sequências de aminoácidos (Perez, Endimiani, Hujer & Bonomo, 2007).

Figura 3: Estrutura de ESBLs representativas. Adaptado de Perez et al. (2007).



A sua classificação é feita segundo dois esquemas: o de Ambler (1991), que tem em conta a forma molecular, e o de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995) que adopta uma classificação funcional. O esquema de Ambler divide as β -lactamases em quatro grandes classes de A a D, com base na homologia proteica. As β -lactamases A, C e D são serino-lactamases e as enzimas de classe B são metalo-lactamases (Ambler, 1991). A classe A de Ambler corresponde às penicilinasas, a B às metalo- β -lactamases, a C às cefalosporinasas e a D às oxacilinasas (Babic, Hujer & Bonomo, 2006). A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as β -lactamases de acordo com as semelhanças funcionais (substrato e perfil inibitório). Existem quatro grupos principais e vários subgrupos. Apesar de mais complexa, devido às várias divisões, acaba por ser mais relevante para o médico ou microbiologista, pois tem em conta inibidores e substratos de β -lactamases clinicamente importantes (Bush et al., 1995). O grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros engloba as cefalosporinasas, que hidrolisam cefalosporinas de espectro alargado e são resistentes ao ácido clavulânico, o grupo 2 inclui as β -lactamases susceptíveis ao ácido clavulânico, o grupo 3 consiste em metalo- β -lactamases, que hidrolisam o imipenem, que são inibidas por ácido etilenodiamino tetra-acético e

resistentes ao ácido clavulânico, e o grupo 4 inclui as restantes β -lactamases (Babic et al., 2006).

Os genes que codificam β -lactamases (genes *bla*) podem estar localizados no cromossoma bacteriano, em plasmídeos ou em transposões, podendo também fazer parte de integrações (Babic et al., 2006).

Muitos géneros de bactérias Gram-negativas possuem naturalmente β -lactamases mediadas por cromossomas, pensando-se que estas enzimas tenham evoluído a partir de PLPs, com as quais partilham alguma homologia sequencial, devido à pressão selectiva exercida por organismos produtores de β -lactâmicos existentes no ambiente (Bradford, 2001).

As β -lactamases cromossómicas são praticamente ubiquitárias nas Enterobacteriaceae. *E. coli* geralmente possui enzimas cromossómicas AmpC, da classe C ou do grupo 1, (Livermore, 1995), cuja expressão não é induzida por exposição a β -lactâmicos devido à ausência do gene *ampR*, mas sim constitutiva.. Esta expressão constitutiva é mínima, não sendo sequer visível num teste de susceptibilidade aos β -lactâmicos. Desde 1989 que são conhecidas AmpC plasmídicas, que podem ser das famílias CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX e AHD. Tanto as β -lactamases AmpC cromossómicas como as plasmídicas, conferem resistência a vários β -lactâmicos como as penicilinas, cefamicinas, oximino-cefalosporinas e aztreonam (de forma variável). As β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos têm distribuição mundial, mas são menos comuns que as ESBL. No caso da *E. coli*, a resistência à cefoxitina é mais frequente por aumento de produção de β -lactamases AmpC cromossómicas (mutações ao nível do promotor) do que devido à existência de AmpC plasmídicas (Jacoby, 2009).

Em geral, as β -lactamases mediadas por plasmídeos são distintas das cromossómicas, mas podem haver algumas sobreposições, como a SHV-1, que normalmente é plasmídica, inclusive em *E. coli*, mas que também é uma β -lactamase cromossómica típica de *K. pneumoniae* (Livermore, 1995). Na década de 60 foi descrita a primeira β -lactamase mediada por plasmídeo em bactérias Gram-negativas, a TEM-1. Como era mediada por plasmídeo e transposões, a sua disseminação para diferentes espécies de bactéria foi facilitada (Bradford, 2001). As enzimas SHV-1 e TEM-1 são penicilinases de largo espectro susceptíveis aos inibidores das β -lactamases (Babic et al., 2006).

O primeiro relato de uma β -lactamase codificada por plasmídeo capaz de hidrolisar cefalosporinas de 3ª geração foi publicado em 1983 (Knothe, Shah, Krcmery, Antal & Mitsuhashi, 1983). Depois foram sendo descobertas outras β -lactamases aparentadas com TEM-1 e TEM-2, capazes de conferir resistência às cefalosporinas de largo espectro (Bradford, 2001) através de mutações num único nucleótido que levam à expansão do centro

activo (Gly238→Ser, Ala237→Thr, Arg164→Ser ou His, Asp179→Asn, e Glu104→Lys) (Babic et al., 2006).

As enzimas que derivam das TEM e SHV podem ser ESBLs ou β -lactamases resistentes aos inibidores (“Inhibitor-Resistant β -Lactamases”), em que as últimas diferem das ESBL por serem resistentes ao ácido clavulânico e sulbactam (Bradford, 2001). São conhecidas 22 TEM resistentes aos inibidores e 4 variantes de SHV. Em geral, as mutações que conferem um fenótipo IRT ocorrem em locais diferentes das mutações ESBL: Met69, Ser130, Arg244, Asn276 e Leu275 (Babic et al., 2006).

De todas as β -lactamases, aquelas que possuem um espectro mais alargado são as carbapenemases, pois além de conferirem resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração também conferem resistência aos carbapenemos (Paterson, 2006). Estas enzimas pertencem às classes A (enzimas codificadas em cromossoma SME, NMC e IMI e em plasmídeos KPC e GES), B (as mais comuns pertencem às famílias VIM, IMP, GIM e SIM) e D (enzimas OXA) (Queenan & Bush, 2007). Recentemente, tem sido alvo de destaque uma nova metalo- β -lactamase com distribuição mundial, a NDM-1 (Kumarasamy et al., 2010).

Nas bactérias Gram-negativas, a permeabilidade da membrana externa e as bombas de efluxo podem ter um papel sinérgico importante na sua resistência intrínseca. Mutações ou alterações induzidas nestes mecanismos podem levar a uma diminuição do influxo e aumento do efluxo de antibióticos, impedindo o seu acesso ao local de acção, trazendo resistência a antibióticos sem relação estrutural, incluindo os β -lactâmicos. Os níveis de resistência conferidos por estes mecanismos são geralmente baixos, mas são reforçados pela acção combinada com outros mecanismos β -lactamase relacionados ou não (Li et al., 2007; Li & Nikaido, 2009).

As cefalosporinas de terceira geração foram introduzidas na prática clínica no início da década de 80, num passo importante contra a resistência a antibióticos mediada por β -lactamases, mas as bactérias responderam desenvolvendo mecanismo de resistência (Paterson & Bonomo, 2005), e actualmente a resistência a estas cefalosporinas pode ser mediada por β -lactamases AmpC da classe C, ESBLs da classe A (família das CTX-M e derivados das TEM e SHV), ESBLs OXA da classe D, ou β -lactamases que hidrolisam carbapenemos das classes A e B (Li et al., 2007).

1.4 ESBLs

Não há ainda um consenso sobre qual é a definição precisa de ESBL, sendo um tema que continua em debate (Lee, Bae & Lee, 2010) e onde continuam a ser propostas novas definições

(Giske et al., 2009). A definição comumente utilizada é de que são β -lactamases capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração e aztreonam, que não conseguem hidrolisar carbapenemos e cefamicinas, e que são inibidas por inibidores de β -lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (Perez, Endimiani, Hujer & Bonomo, 2007). O facto de as ESBLs serem prontamente inibidas pelo ácido clavulânico e terem acção contra cefamicinas ajuda a distingui-las fenotipicamente das β -lactamases AmpC (Paterson & Bonomo, 2005). No entanto, é necessário ter em atenção que as estirpes produtoras de ESBL são muitas vezes produtoras em simultâneo de outras β -lactamases e podem possuir outros factores de resistência (Babic et al, 2006), podendo, por exemplo, ser resistentes às cefamicinas devido a perda de uma proteína da membrana externa (porina) (Giamarellou, 2005).

As ESBLs pertencem às classes A e D de Ambler, e aos grupos 2be ou 2d de Bush-Jacoby-Medeiros, e são maioritariamente derivadas de TEM, SHV, OXA e CTX-M (Li et al., 2007). Menos frequentemente, podem derivar de enzimas BES, GES-1, VEB e PER (Drawz & Bonomo, 2010).

As ESBL codificadas por plasmídeos raramente eram detectadas em bactérias de origem animal mas têm sido cada vez mais observadas pelo mundo, com a maioria a pertencer à família das CTX-M (Drawz & Bonomo, 2010). Estas enzimas tiveram origem em três espécies diferentes de *Kluyvera* spp (Hawkey, 2008), e constituem um grupo que engloba mais de 70 enzimas diferentes, divididas em cinco grupos consoante a sua sequência de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25) (Ewers, Grobbel, Bethe, Wieler & Guenther, 2011).

A primeira enzima CTX-M foi descrita no Japão em 1986, com origem num cão usado em estudos farmacocinéticos de β -lactâmicos (Matsumoto, Ikeda, Kamimura, Yokota & Mine, 1988). Os plasmídeos codificadores de CTX-M muitas vezes também transportam genes *bla*_{TEM} e genes que conferem resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetopim e tetraciclina (Bonnet, 2004). A existência de múltiplos determinantes de resistência num único plasmídeo sugere que a presença de qualquer um dos fármacos para a qual ocorre resistência vai ter um efeito selectivo, podendo seleccionar para a resistência de outros antibióticos (Li et al., 2007).

Ao contrário da maioria das ESBL derivadas de TEM e SHV, as CTX-M hidrolisam cefotaxima e ceftriaxona melhor que a ceftazidima, e parecem ser mais facilmente inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico (Perez et al., 2007).

Desde o ano 2000 que, em medicina humana, as enzimas CTX-M se têm vindo a revelar a família de ESBLs mais relevante a nível clínico e da comunidade, suplantando as enzimas

pertencentes às famílias TEM e SHV (Bonnet, 2004). É também desde este ano que têm sido publicados estudos em que foram encontradas ESBLs em animais de companhia (Tabela 3).

Tabela 3: Presença de *E. coli* produtora de ESBL em cães e gatos por ordem cronológica de data de publicação. Adaptado e traduzido de Ewers et al. (2011).

Referência	Espécie animal	Doentes/Saudáveis	Nº de isolados produtores de ESBL/nº total (%)*	β-lactamases (% do nº total de isolados produtores de β-lactamase)	Espécie	País
Matsumoto et al., 1988	Cão	Saudável	NE	FEC-1 (= CTX-M-tipo)	<i>E. coli</i>	Japão
Teshager et al., 2000	Cão	ITU recorrente	1/1 (caso clínico)	SHV-12	<i>E. coli</i>	Espanha
Féria et al., 2002	Cão	ITU	3 [11]/72 (4.2)	SHV ^A ; AmpC ^A	<i>E. coli</i>	Portugal
Costa et al., 2004	Cão	Saudável	4/39 (10.3)	TEM-52 (75), CTX-M-1 (25)	<i>E. coli</i>	Portugal
Carattoli et al., 2005	Cão	NE	15 [2]/226 (7.5)	CTX-M-1 (76.5); SHV-12 (23.5); CMY-2 (11.8) CTX-M-1 (66.6); TEM ^A (33.3)	<i>E. coli</i>	Itália
	Gato	NE	3/72 (4.2)			
Sidjabat et al., 2006	Cão	ITU, IF	11/11 (PS)	TEM ^A (100); CMY-7 (100)	<i>E. coli</i>	Australia
Moreno et al., 2008	Cão	Hospitaliza-do	10/NE	CTX-M-1 (40), CTX-M-14 (60), PER-2 (50) CTX-M-1 (100), PER-2 (75)	<i>E. coli</i>	Chile
	Gato	Hospitaliza-do	4/NE			
Steen et al., 2007	Cão	FI (2); ITU (1)	3/3 (100) (PS)	CTX-M-tipo (100)	<i>E. coli</i>	Reino Unido
Costa et al., 2008	Cão	Saudável	6/78 (7.8)	CTX-M-1 (33.3); TEM ^A (66.6) TEM ^A (100)	<i>E. coli</i>	Portugal
	Gato	Saudável	8/66 (12.1)			
Ma et al., 2009	Cão & Gato	ITG; ITR	36/NE	CTX-M-9 grupo; CTX-M-1-grupo; DHA-1, CMY-2 ^B	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i> <i>E. cloacae</i>	China
Pomba et al., 2009	Cão	ITU	1/41 (2.4)	CTX-M-15 (100)	<i>E. coli</i> **	Portugal
Sun et al., 2010	Cão & Gato	Doente & Saudável	97/240 (40.4)	CTX-M-14 (46.4); CTX-M-55 (24.7); CTX-M-27 (8.2); CTX-M-24 (8.2); CTX-M-15 (6.2); CTX-M-65 (6.2); CTX-M-3 (5.2); CTX-M-64 (3.1); CTX-M-9 (2.1); SHV-12 (1)	<i>E. coli</i>	China
SVARM, 2009	Cão Gato	IF ITU	1/ NE 1/ NE	CTX-M-1 CTX-M-1	<i>E. coli</i>	Suécia
Ewers et al., 2010b	Cão	ITU; IF, ITG	9 (ST13 1)/84 ESBL ^C	CTX-M-15 (10.7) ^C ; SHV-12 (1.2) ^C	<i>E. coli</i> **	Europa
Gibson et al., 2010	Cão	ITUG, IF, outro	2[34]/ NE	SHV-12 (2.9); CMY-2 (20); CMY-7 (77.1); CIT (2.9); OXA-10 (2.9)	<i>E. coli</i>	Austrália
O'Keefe et al., 2010	Cão & Gato	ITU	11/150 (7.3)	SHV-12 (9.1); CTX-M-14 (9.1); CTX-M-15 (81.8)	<i>E. coli</i>	EUA

ITU: infecção do tracto urinário; ITUG: infecção do tracto urogenital; ITR: infecção do tracto respiratório; IGI: infecção do tracto gastrointestinal; IF: infecção de ferida; NE – não especificado; PS – pré-seleccionado

A Não caracterizada genotipicamente;

B Ma et al. (2009), investigou animais de companhia e de produção, mas não forneceu informação detalhada da distribuição de genes codificadores de ESBL nestes grupos.

C Só foram investigadas *E. coli* produtoras de ESBL. Foco na identificação e caracterização de O25b:H4-ST131 CTX-M-15.

* Só quando β-lactamases AmpC foram detectadas ao mesmo tempo que ESBLs foram incluídas na tabela (número em parênteses rectos).

** Multi locus sequence type ST131.

Segundo Ewers et al. (2011), apesar do número limitado de estudos em animais de companhia (Tabela 3), parece haver uma evolução semelhante à observada em medicina humana. Além disso, consideram que o aparecimento e propagação a nível mundial do grupo de *E. coli* B2-O25b:H4-ST131-CTX-M-15 no âmbito da clínica em medicina humana tiveram um desenvolvimento paralelo ao que aconteceu na medicina veterinária. Esta emergência simultânea do grupo clonal ST131 em humanos e animais de companhia levanta a necessidade de se considerarem novos focos de infecção e de se monitorizar os níveis de ESBL em animais de companhia (Ewers et al., 2010).

1.5 *Escherichia coli*

A *E. coli* comensal pertence à família Enterobacteriaceae. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e fermentador da lactose, que habita o tracto intestinal de animais saudáveis. A colonização do tracto intestinal dos mamíferos dá-se pouco tempo após o seu nascimento, e estes organismos permanecem membros importantes da microbiota intestinal durante toda a vida. A maioria das estirpes de *E. coli* é pouco virulenta, mas podem dar origem a infecções oportunistas em localizações extra-intestinais, como a glândula mamária e tracto genitourinário. As estirpes patogénicas possuem factores de virulência que lhes permitem aderir a superfícies mucosas e desta maneira colonizar o hospedeiro e provocar doença (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002).

As bactérias comensais como *E. coli* constituem um reservatório de genes de resistência para bactérias patogénicas. O seu nível de resistência é considerado um bom indicador da pressão selectiva exercida pelo uso de antibióticos e do tipo de resistências que se pode esperar encontrar em agentes patogénicos. Monitorizar a prevalência de resistência em bactérias indicadoras como a *E. coli* fecal em diferentes populações de animais e humanos, saudáveis ou doentes, torna possível a comparação de prevalências e a detecção da transferência de bactérias resistentes ou de genes de resistência de animais para humanos e vice-versa (van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

A principal área de atenção na investigação de *E. coli* envolve a produção de β -lactamases, devido a importância dos antibióticos β -lactâmicos no tratamento de infecções em humanos e animais e à preocupação com a transmissão de estirpes resistentes entre animais e humanos. O facto de poder existir transmissão interespecies implica que estirpes de *E. coli* resistentes a antimicrobianos podem constituir um problema de saúde pública (Weese, 2008), mas é difícil

determinar a frequência deste tipo de zoonose devido à dificuldade em reconhecer e validar a transmissão pelo animal de companhia (Guardabassi et al., 2004).

Os cães constituem uma fonte potencial de *E. coli* patogénica que pode ser transmitida de várias maneiras, como por exemplo através de lesões cutâneas (mordeduras ou arranhões) (Johnson, Perencevich, Lincalis & Venezia, 2006). As fezes caninas também podem constituir um reservatório de *E. coli* patogénica, nomeadamente *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC), o que sugere que os humanos podem adquirir bactérias patogénicas através do contacto indirecto ou directo com as fezes (Johnson, Stell & Delavari, 2001). Johnson & Clabots (2006) realizaram um estudo longitudinal com o objectivo de avaliar transmissão de ExPEC dentro do agregado familiar e de que forma é que isso contribui para a patogénese da infecção do tracto urinário, em que três dos sete clones de *E. coli* isolados evidenciavam padrões de transmissão hospedeiro-hospedeiro, e o clone responsável pela ITU da mãe era o mais partilhado dentro da família, incluindo o cão. Além da ExPEC, também pode haver partilha de *E. coli* enteropatogénica (Rodrigues, Thomazini, Lopes & Dantas, 2004), e de *E. coli* ST131 (Johnson, Miller, Johnston, Clabots & DebRoy, 2009).

É necessário ter em conta que assim como os canídeos podem constituir uma fonte de *E. coli* resistentes aos antibióticos, o contrário também pode acontecer. No estudo de Stenske et al. (2009) pretendia-se determinar a prevalência de partilha de *E. coli* fecal entre cães e os seus donos, e ao compararem a susceptibilidade a vários antibióticos entre isolados dos pares cão-dono não foram encontradas diferenças de susceptibilidade entre os pares, mas os donos e humanos do grupo de controlo eram portadores de mais *E. coli* multirresistente que os cães. Estes resultados sugerem que é mais provável haver transmissão de *E. coli* multirresistente dos donos para os seus animais do que vice-versa, o que vai de encontro aos resultados de um estudo de Skurnik et al. (2006). Estes determinaram que isolados de *E. coli* obtidos de fezes de animais que nunca tinham tido contacto com humanos não apresentavam resistência a antibióticos, e que havia um aumento da resistência à medida que aumentava a exposição a humanos.

A vasta quantidade de *E. coli* no tracto intestinal é uma potencial fonte de preocupação devido ao seu papel reservatório de genes de resistência, e por isso já foi usada para determinar padrões de susceptibilidade em animais saudáveis ou não (Weese, 2008).

Muitos dos estudos sobre resistência a antibióticos em animais de companhia avaliaram as resistências em isolados de *E. coli*. Os primeiros estudos nesta área utilizavam amostras submetidas a análise laboratorial (Normand, Gibson, Reid, Carmichael & Taylor, 2000; Authier, Paquette, Labrecque & Messier, 2006) mas em anos mais recentes foram publicados estudos sobre a prevalência de *E. coli* multirresistente em animais saudáveis no Reino Unido

(Wedley et al., 2011), Canadá (Murphy et al., 2009), China (Lei et al., 2010), Suécia (SVARM, 2006) e Dinamarca (Damborg, Sørensen & Guardabassi, 2008), que recorreram a uma amostra significativa de animais. Também já foram isoladas *E. coli* produtoras de ESBL em cães e gatos saudáveis e em amostras obtidas de animais doentes (Tabela 3). Em Portugal foi apenas realizado um estudo sobre resistência a antibióticos em *E. coli* de cães e gatos saudáveis, por Costa et al. (2008), onde a resistência às cefalosporinas de 3ª geração e outros antibióticos β -lactâmicos era muito baixa. No entanto, a amostra de canídeos era reduzida (n=39) e oriunda da região Norte de Portugal. Na Europa, a monitorização dos níveis de resistência a antibióticos em animais de companhia é efectuada a nível nacional na Suécia (SVARM, 2009) e Alemanha (Grobbel et al., 2007), não sendo efectuada noutros países.

O facto de estes estudos demonstrarem a ocorrência de multirresistência a antibióticos, particularmente no caso da *E. coli* comensal de cães saudáveis, é preocupante devido à proximidade entre humanos e animais de companhia e ao risco de disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência. Como são escassos os dados referentes a Portugal, é importante que os animais de companhia sejam alvos de um estudo epidemiológico abrangente, de resistência ao nível de bactérias indicadoras como *E. coli*.

2. Objectivos

Devido à crescente problemática do desenvolvimento de multirresistências a antimicrobianos criticamente importantes e à possibilidade de transferência destas resistências entre animais de companhia e humanos, este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL) com os objectivos de:

Avaliar a resistência às cefalosporinas de terceira geração de isolados de *Escherichia coli* comensal de cães saudáveis;

Avaliar a frequência de multirresistência e quais os fenótipos mais frequentes;

Determinar se existem bactérias produtoras de ESBL na população bacteriana e, consequentemente, na população canina, oriunda da área da Grande Lisboa.

3. Materiais e Métodos

3.1 Colheita das amostras

As amostras foram recolhidas de cães considerados saudáveis num hospital veterinário de animais de companhia (anexo I), localizado na Tapada das Mercês, concelho de Sintra.

Foram considerados cães saudáveis aqueles que se apresentavam para consulta de rotina (vacinações, análises), para realização de algum procedimento electivo (cirurgia, tosquia, corte de unhas), ou com patologia sem presença de sinais clínicos sistémicos ou de infecção no local da colheita. Foram excluídos animais que tinham efectuado algum tipo de antibioterapia há menos de um mês, ou que tivessem sofrido algum episódio de vômito ou diarreia há menos de uma semana.

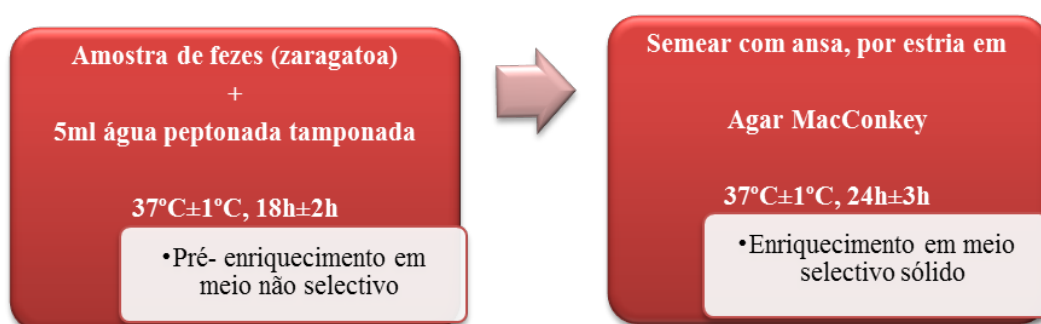
Na planificação do projecto considerou-se uma prevalência esperada de ESBLs de 10%. Assim, seria necessária uma amostra de 139 animais ($n = 139$) para uma margem de erro de 5% e um intervalo de confiança de 95%.

No total foram recolhidas amostras de fezes a 151 cães ($n=151$). A recolha foi feita nos meses de Novembro de 2010 a Janeiro de 2011, através de zaragatoa com meio de conservação. Cada zaragatoa foi identificada com um código individual para cada animal, e no momento da colheita foi feito um pequeno questionário (anexo V) sobre cada animal referente à sua idade, sexo, morada, uso de antibióticos no último mês e último ano e hospitalizações no último ano. As zaragatoas foram transportadas para o Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRAB) da FMV-UTL e processadas dois a sete dias após a colheita. Enquanto não foram processadas, as zaragatoas foram mantidas à temperatura ambiente.

3.2 Isolamento de *Escherichia coli* comensal

As amostras foram analisadas para a pesquisa de *E. coli* através de um protocolo desenvolvido pelo LRAB da FMV-UTL (Figura 4).

Figura 4: Protocolo laboratorial de isolamento de *E. coli* a partir de zaragatoas de fezes de cão.



Cada zaragatoa foi colocada em 5ml de água peptonada tamponada (BPW, Scharlau, Barcelona, Espanha), homogeneizada e incubada a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h}\pm 2\text{h}$. Após incubação, semeou-se cada amostra com uma ansa de $10\mu\text{l}$ por estria em placas de agar MacConkey (Mck, Merck, Darmstadt, Alemanha). Nessa placa foi colocado um disco de cefotaxima (ctx) $30\mu\text{g}$ (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) para aumentar a probabilidade de se detectarem as colónias resistentes, como descrito por Kennedy & Collignon (2010). As placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h}\pm 3\text{h}$.

As amostras positivas a *E. coli* nas placas de agar MacConkey, segundo critérios de morfologia, cor e cheiro das colónias, foram repicadas para placas de agar Müeller-Hinton (MH2, Biomérieux) e incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h}\pm 3\text{h}$. Foi dada preferência às que se encontravam junto ao disco de ctx.

Nos casos em que havia dúvida na avaliação da morfologia das colónias ou era difícil obter uma colónia isolada, foi feita repicagem para meio de XLD (agar de desoxicolato-lisina-xilose) e CLED (agar de cistina lactose deficiente em electrólitos). Após avaliação da morfologia e cor das colónias, foram repicadas para agar Müeller-Hinton.

3.3 Identificação de isolados de *Escherichia coli* comensal

3.3.1 Extracção de ADN

A partir das colónias que cresciam em agar Müeller-Hinton foi feita extracção de ADN pelo método de fervura utilizado no LRAB.

Num tubo eppendorf colocou-se $1000\mu\text{l}$ de água MiliQ e uma fracção de colónias de cultura pura de *E. coli* e levou-se a centrifugar durante 8 minutos a $16,110\text{g}$ (rotor F-45-24-11, Eppendorf 5415D, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito em $500\mu\text{l}$ de água MiliQ. Voltou-se a centrifugar a amostra durante 2 minutos a $16,110\text{g}$. Decantou-se o sobrenadante e repetiu-se o último passo. Após nova decantação, ressuspendeu-se o depósito em $100\mu\text{l}$ de água MiliQ e ferveu-se em banho-maria durante 15 minutos. Voltou-se a centrifugar durante 8 minutos a $16,110\text{g}$ e recolheu-se o sobrenadante para um tubo eppendorf novo.

3.3.2 Identificação por PCR

Segundo McDaniels et al. (1996), a enzima glutamato descarboxilase (GAD), codificada pelos genes *gadA* e *gadB*, é específica de *E. coli* e, um método que utilize a detecção desta

enzima como processo de identificação genotípica de isolados de *E. coli* aumenta a especificidade e a sensibilidade do teste (Rice, Johnson, Dunnigan & Reasoner, 1993).

Como os dois genes *gadA* e *gadB* são extremamente homólogos entre si e ocorrem sempre no genoma de *E. coli*, o ADN extraído foi submetido a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificação específica do gene *gadA/B*. O método utilizado foi estabelecido pelo LRAB da FMV-UTL, adaptado de McDaniels et al. (1996), tendo em conta os *primers* necessários e a *Taq* Polimerase utilizada.

Figura 5: Sequência genómica do *primer* GADAB *forward*(F) e *reverse*(R) utilizado no PCR para identificação dos isolados de *E. coli* segundo McDaniels et al (1996).

forward 5' – ACCTGCGTTGCGTAAATA – 3'
reverse 5' – GGGCGGGAGAAGTTGATG – 3'

O PCR foi feito num volume final de 25µl contendo 2µl de ADN, 2µl de cada um dos primers (10pmol/ml) GADABF e GADABR (Figura 5), 0,25µl de NZYTaQ (25mM), 5µl de tampão 5x NZYTech, 1,5µl de MgCl₂ (50 mM), 0,4µl de dNTPs mix, 0,26µl de DMSO e água MiliQ. Os ciclos de amplificação utilizados consistem numa desnaturação inicial (2 minutos a 94°C) seguida de 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 54° C) e extensão (60 segundos a 72°C), com uma extensão final (10 minutos a 72°C).

Após PCR, os produtos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% w/v contendo 0,2µl/ml de Brometo de Etídeo (Sigma), durante 3 horas, a 4,5 V/cm. Foi utilizado 0,5µg/µl de GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas International Inc, Ontário, Canadá) como marcador de peso molecular de ADN.

3.4 Susceptibilidade aos antibióticos

Para testar a susceptibilidade dos isolados de *E. coli* foi utilizado o método de difusão de discos. Foram utilizados discos (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) de amoxicilina (25µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefotaxima (30µg), cefoxitima (30µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg) e trimetoprim/sulfametoxazole (1.25/23.7µg).

Foram utilizadas placas de agar Müeller-Hinton e colónias de cultura pura de *E. coli*. Os resultados foram lidos após incubação a 37°C±1°C durante 18-20h e interpretados de acordo com os critérios do “Clinical and Laboratory Standards Institute” para animais (CLSI, 2008). Quando não estavam disponíveis para bactérias de origem animal, foram utilizados critérios

para bactérias de origem humana (CLSI, 2006) (Tabela 4). Como controlo dos ensaios foi utilizada *E. coli* ATCC 25922.

Os resultados foram analisados de acordo com os padrões de resistência apresentados, considerando-se que um isolado resistente a uma classe de antibióticos tem resistência simples, resistente a duas classes diferentes tem resistência múltipla e resistentes a três ou mais classes é multirresistente, e que um isolado sem resistências é um isolado susceptível.

Ao mesmo tempo foi aplicado o método de duplo disco para detecção de sinergias entre cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico (Double-disk synergy test – DDST), para detecção fenotípica de ESBLs (Drieux, Brossier, Sougakoff & Jarlier, 2008).

Tabela 4: Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos.

Classe do Antibiótico	Antibiótico	Abreviatura	Disco (µg)	Diâmetro (mm)		
				S	I	R
Penicilinas ^a	Amoxicilina	Aml	25	≥17	14-16	≤13
Penicilinas associadas ^a	Amoxicilina /ácido clavulânico	Amc	20/10	≥18	14-17	≤13
Cefalosporinas ^a	Cefoxitina	Fox	30	≥18	15-17	≤14
	Cefotaxima	Ctx	30	≥23	15-22	≤14
Sulfonamidas potenciadas	Trimetoprim - sulfametoxazol	Sxt	1,25/23,7	≥16	11-15	≤10
Aminoglicosídeos	Gentamicina	Cn	10	≥16	13-15	≤12
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Enr	5	≥23	17-22	≤16

^a Antibióticos β-lactâmicos

3.5 PCR multiplex β-lactamases e PCR CTX-M

Após realização dos testes de susceptibilidade a antibióticos, foram realizados PCRs para determinar qual ou quais os grupos de genes responsáveis pelas resistências e/ou susceptibilidades intermédias observadas em relação aos antibióticos β-lactâmicos.

O PCR multiplex β-lactamases foi desenvolvido por Pomba et al (2006), para detecção dos genes de resistência às β-lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} e *ampC*. Como controlo positivo foram utilizadas *E. coli* 5825/04 (estirpe produtora de OXA-1, TEM-1B) (Pomba, da Fonseca, Baptista, Correia & Martínez-Martínez, 2009) e uma estirpe transconjugante de *E. coli* K12 produtora de SHV-5.

Este PCR foi feito num volume final de 50µl contendo 2µl de ADN, 1µl de cada um dos *primers* (Tabela 5) P1 (10pmol/ml), P2 (10pmol/ml), *ampC*634f (10pmol/ml), *ampC*634r (10pmol/ml), *oxa1f* (10pmol/ml) e *oxa1r* (10pmol/ml), 3µl de cada um dos *primers* *shvf1*

(10pmol/ml) e shvr (10pmol/ml), 0,3µl de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 5µl de tampão 10x s/ MgCl₂, 6µl de MgCl₂, 0,8µl de dNTPs mix (25mM), 0,26µl de DMSO e água MiliQ. Os ciclos de amplificação utilizados consistem numa desnaturação inicial (7 minutos a 94° C) seguida de 30 ciclos de hibridação (5 minutos a 61° C), extensão (1 minuto a 72° C) e desnaturação (1 minuto a 94° C), seguido de uma hibridação única (2 minutos a 61° C) e de uma extensão final (5 minutos a 72° C).

Após PCR, as cadeias amplificadas foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose a 1,8% w/v, durante 3 horas a 4,5V/cm. Foi utilizado 0,5µg/µl de GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas International Inc, Ontário, Canadá) como marcador de peso molecular de ADN. A cada gel de 300ml foi adicionado 10µl de Brometo de Etídeo 10mg/ml (Sigma) para actuar como revelador.

O PCR CTX-M, segundo o utilizado por Eldestein et al (2003), foi feito num volume final de 50µl contendo 2µl de ADN, 1,25µl de cada um dos *primers* (Tabela 5) ctxf (10pmol/ml) e ctxr (10pmol/ml), 0,3µl de Taq DNA Polymerase (Fermentas), 5µl de tampão 10x s/ MgCl₂, 6µl de MgCl₂ (25mM) 0,5µl de dNTPs mix (25mM), 0,26µl de DMSO e água MiliQ. Os ciclos de amplificação utilizados consistem numa desnaturação inicial (7 minutos a 94° C) seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), hibridação (2 minutos a 56° C) e extensão (1 minuto a 72° C), seguido de uma extensão final (10 minutos a 72° C). Como controlo positivo foi utilizada *E. coli* 5825/04.

Após PCR, os produtos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% w/v, durante 3 horas a 4,5V/cm. Foi utilizado 0,5µg/µl de GeneRuler 100bp DNA Ladder.

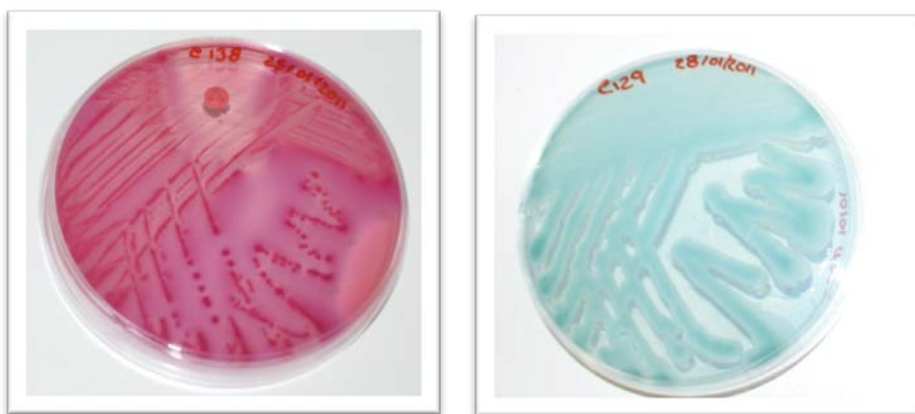
Tabela 5: Lista de *primers* utilizados no PCR multiplex β-lactamases e PCR CTX-M

<i>Primers</i>	Sequência de nucleótidos	Dimensão do produto de PCR
P1	5' TACGATACGGGAGGGCTTAC 3'	716 pb
P2	5' TTCCTGTTTTTGCTCACCCA 3'	
shvf1	5' TCAGCGAAAAACACCTTG 3'	471 pb
shvr	5' TCCCGCAGATAAATCACCA 3'	
ampC634f	5' CCCCgCTTATAGAGCAACAA 3'	634 pb
ampC634r	5' TCAATGGTcGACTTCACACC 3'	
oxa1f	5' TATCTACAGCAGCGCCAGTG 3'	199 pb
oxa1r	5' CGCATCAAATGCCATAAGTG 3'	
CTXf	5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3'	544 pb
CTXr	5' CGATATCGTTGGTGGTGCCATA 3'	

4. Resultados

Das 151 amostras colhidas foram obtidos 135 isolados de *E. coli*, correspondentes a 135 cães (n=135). Durante o isolamento foram considerados negativos para *E. coli* 9 amostras: 3 não apresentaram crescimento inicial em agar MacConkey e 6 apresentavam colónias de morfologia incompatível com *E. coli* (Figura 6). No PCR *gadA/B* foram dados como negativos 7 isolados.

Figura 6: Colónias em agar MacConkey compatíveis com *E. coli* e colónias em meio CLED compatíveis com *Klebsiella spp.*



A média de idade dos cães foi de 3,6 anos (intervalo de 3 dias a 14 anos). Quarenta e quatro cães eram de raça indeterminada (32.6% da população) e os outros dividem-se por 41 raças puras diferentes (anexo VI). As fêmeas (n=73) constituem um grupo ligeiramente maior do que os machos (n=62) (Gráfico 1). Metade dos animais reside com um dono (Gráfico 2). Os animais distribuem-se por treze concelhos diferentes, com a maioria a residir no concelho de Sintra (Gráfico 3).

Gráfico 1: Percentagem de cada sexo entre os animais em estudo.

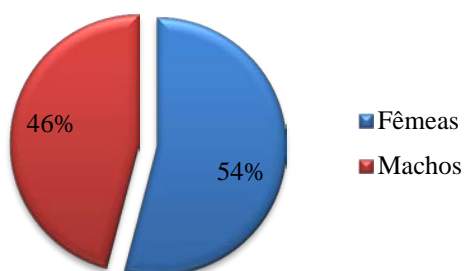


Gráfico 2: Percentagem de animais que vivem numa associação, com um criador ou com um dono particular.

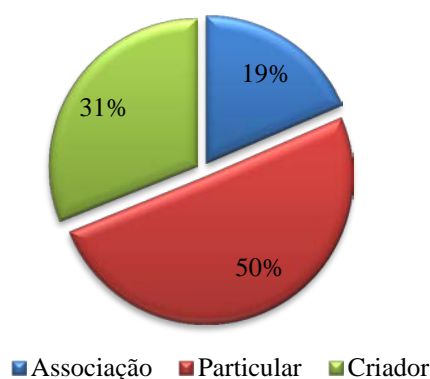
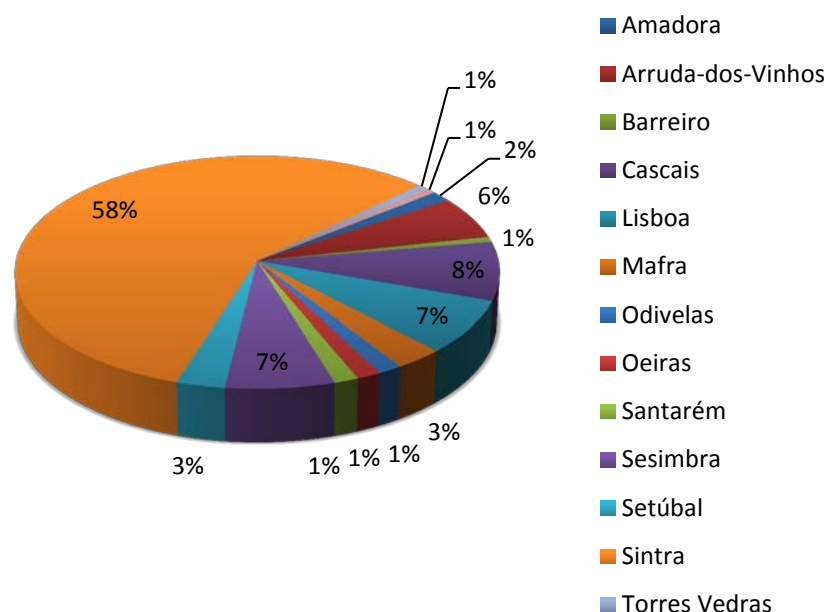


Gráfico 3: Distribuição geográfica dos animais por Concelho.



Dos 135 animais em estudo, 19 tomaram um ou mais antibióticos no último ano (num dos cães não foi possível determinar quais). Destes, 17 tomaram pelo menos um antibiótico β -lactâmico, nomeadamente amoxicilina/ácido clavulânico (n=15), ceftriaxona (n=4) e cefovecina (n=1). Os restantes antibióticos incluíam metronidazol (n=5), cloranfenicol (n=2), enrofloxacina (n=1) e azitromicina (n=1) (anexo VI).

Apenas 51% (n=69) das bactérias isoladas apresenta susceptibilidade a todos os antibióticos testados. Existem cinco isolados com susceptibilidade intermédia à amoxicilina e um à gentamicina. São resistentes a pelo menos um antibiótico 49% (n=60) dos isolados (Tabela 6). Destes isolados, 58 são resistentes a pelo menos um antibiótico β -lactâmico. Foram encontradas resistências a todos os antibióticos em estudo, com particular incidência à

amoxicilina e ao trimetoprim/sulfametoxazol (Tabela 6). Apresentam resistência simultânea à cefotaxima e enrofloxacina, antibióticos considerados CI 13% (n=17) dos isolados.

Foram obtidos 21 perfis de resistência diferentes (Tabela 7). Na população, 17% (n=23) dos indivíduos possui *E. coli* multirresistente. Dentro dos isolados com multirresistência, 17 são resistentes à cefotaxima e 21 à enrofloxacina. Foi pouco frequente encontrar resistência a um só antibiótico (n=8), com 52 dos isolados a apresentarem resistência a pelo menos dois antibióticos (Gráfico 4).

Tabela 6: Prevalência (%) de resistência e susceptibilidade intermédia aos antibióticos testados, observada em *E. coli* de origem canina.

Antibiótico	R ^a	I ^a
Amoxicilina	43	4
Amoxicilina/ácido clavulânico	24	4
Cefoxitina	25	1
Cefotaxima	18	8
Enrofloxacina	16	3
Gentamicina	4	8
Trimetoprim/Sulfametoxazol	30	1

^aR, resistência; I, susceptibilidade intermédia

Gráfico 4: Frequência absoluta de isolados de *E. coli* com resistência a 1-7 antibióticos pelo método de difusão em disco.

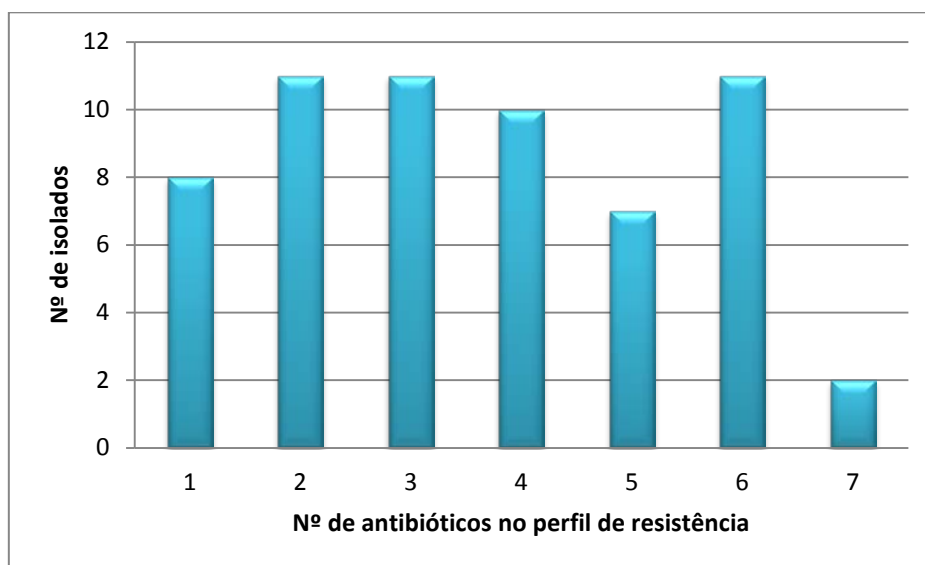


Tabela 7: Perfis de resistência observados nos isolados de *Escherichia coli* pelo método de difusão de discos.

Perfis de resistência	Nº de isolados
Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	9
Aml Sxt	9
Amc Aml Fox	7
Aml	6
Amc Aml Fox Sxt	4
Amc Aml Ctx Fox	3
Aml Ctx Enr Sxt	3
Amc Aml Cn Ctx Enr Fox Sxt	2
Amc Aml Cn Enr Fox Sxt	2
Amc Aml Enr Fox Sxt	2
Aml Ctx Enr Fox Sxt	2
Sxt	2
Amc Aml Ctx Enr Fox	1
Amc Aml Cn Ctx Sxt	1
Amc Aml Ctx Fox Sxt	1
Amc Aml Sxt	1
Aml Enr Sxt	1
Aml Cn Sxt	1
Aml Ctx Sxt	1
Aml Ctx	1
Aml Fox	1

Em relação ao DDST, foram observadas sinergias entre a cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico em 5 isolados (Figura 7).

Figura 7: Observação de sinergias pelo DDST, entre os discos de cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico, em placas de TSA de isolados de *E. coli*.



Foram positivos ao PCR CTX-M 5 isolados de *E. coli* (3,7%), sendo os mesmos isolados em que tinha sido observada sinergia no DDST (Tabela 8). Apenas o cão C22 apresentava história de toma de antibióticos no último ano, nomeadamente amoxicilina/ácido clavulânico, metronidazol e cefovecina. Refira-se que o animal C22 viveu em ambiente hospitalar no último ano.

Tabela 8: Amostras positivas ao PCR CTX-M para pesquisa de genes codificadores de ESBLs produtoras de CTX-M e perfis de resistência associados.

Código da amostra	Perfil de resistência
C22	Aml Ctx Enr Sxt
C39	Aml Ctx Enr Sxt
C110	Aml Ctx Sxt
C115	Aml Ctx Enr Sxt
C124	Aml Ctx

No PCR multiplex β -lactamases foram encontrados 34 isolados produtores de TEM, 3 produtores de OXA-1 e 1 produtor de SHV, com alguns dos isolados a produzir várias β -lactamases em simultâneo (Tabela 9), inclusive CTX-M (isolados C22 e C110 são produtores de enzimas CTX-M e TEM).

Tabela 9: Resultados do PCR multiplex β -lactamases para pesquisa de genes codificadores de resistência a antibióticos β -lactâmicos, perfis de resistência associados e tratamento antibiótico no ano anterior.

Código da amostra	Genes detectados	Perfil de resistência	Tratamento antibiótico (ano anterior)
6	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	N/E
11	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox Sxt	N/E
13	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox Sxt	N/E
15	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox	N/E
16	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	Amoxicilina /ácido clavulânico; metronidazol
17	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV}	Amc Aml Fox	N/E
19	<i>bla</i> _{OXA-1}	Amc Aml Sxt	N/E

Tabela 9 (continuação): Resultados do PCR multiplex β -lactamases para pesquisa de genes codificadores de resistência a antibióticos β -lactâmicos, perfis de resistência associados e tratamento antibiótico no ano anterior.

20	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}	Amc Aml Cn Ctx Enr Fox Sxt	Amoxicilina /ácido clavulânico
22	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Ctx Enr Sxt	Amoxicilina /ácido clavulânico; metronidazol; cefovecina
31	<i>bla</i> _{TEM}	Aml	N/E
36	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Enr Sxt Ctx Fox	N/E
42	<i>bla</i> _{TEM}	Aml	N/E
54	<i>bla</i> _{TEM}	Aml	N/E
55	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	N/E
56	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Ctx Enr Fox Sxt	N/E
60	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
76	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
87	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Enr Fox Sxt	Amoxicilina/ácido clavulânico; enrofloxacina; azitromicina; cloranfenicol
90	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Ctx Enr Fox Sxt	Amoxicilina/ácido clavulânico
94	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	N/E
95	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Cn Ctx Enr Fox Sxt	N/E
97	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
101	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox	Cloranfenicol
103	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
105	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Cn Enr Fox Sxt	N/E
106	<i>bla</i> _{TEM}	Aml	N/E
110	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Ctx Sxt	N/E
130	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox Sxt	N/E
131	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
132	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Fox	N/E
133	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Enr Fox	N/E

Tabela 9 (continuação): Resultados do PCR multiplex β -lactamases para pesquisa de genes codificadores de resistência a antibióticos β -lactâmicos, perfis de resistência associados e tratamento antibiótico no ano anterior.

140	<i>bla</i> _{TEM}	Amc Aml Ctx Fox Sxt	N/E
145	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Cn Sxt	N/E
147	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
149	<i>bla</i> _{TEM}	Aml Sxt	N/E
150	<i>bla</i> _{TEM}	Aml	Amoxicilina/ácido clavulânico; metronidazol

Abreviaturas: N/E – nenhum

Vários isolados foram negativos ao PCR multiplex β -lactamases (n=27), e 24 isolados foram negativos ao PCR multiplex β -lactamases e CTX-M, incluindo os isolados com susceptibilidade intermédia à amoxicilina (Tabela 10).

Tabela 10: Perfis de resistência dos isolados negativos aos PCR multiplex β -lactamases e PCR CTX-M.

Perfis de resistência	Nº de isolados
Amc Aml Ctx Enr Fox Sxt	3
Amc Aml Ctx Fox	3
Amc Aml Fox	2
Amc Aml Cn Enr Fox Sxt	2
Aml Sxt	2
Aml	1
Amc Aml Fox Sxt	1
Amc Aml Enr Fox Sxt	1
Aml Enr Sxt	1
Aml Fox	1
Amc Aml Cn Ctx Sxt	1

5. Discussão

A resistência a antibióticos ao nível da *E. coli* comensal, bactéria indicadora dos níveis de resistência a antibióticos na microbiota intestinal de diferentes espécies animais (van den Bogaard & Stobberingh, 2000), é importante devido ao potencial risco de saúde pública que representam, pela possibilidade de haver transferência de resistências a bactérias patogénicas (Guardabassi et al., 2004).

Considerando a escala de Knezevic e Petrovic (2008) para efeitos de discussão, esperava-se encontrar uma prevalência de resistência muito baixa (0-10%) para as classes de antibióticos testadas, tendo em conta os resultados obtidos num estudo semelhante realizado em Portugal por Costa et al (2008). No entanto, no nosso estudo obtivemos uma prevalência de resistência moderada (>30–50%) à amoxicilina (43%), baixa (>10–30%) ao trimetoprim/sulfametoxazol (30%), cefoxitina (25%), amoxicilina/ácido clavulânico (24%), cefotaxima (18%) e enrofloxacin (16%), e muito baixa à gentamicina (4%). Os resultados obtidos tornam-se ainda mais significativos quando consideramos que alguns dos antibióticos testados são considerados CI em medicina humana pela FAO/WHO/OIE.

É necessário ter em conta que a comparação directa entre este tipo de estudos é difícil, pois não existe um método padronizado de investigação pré-estabelecido, havendo variação nos métodos de isolamento, número e tipo de antibióticos avaliados, e dimensão da população que nem sempre é representativa (Murphy et al., 2009). Apesar disso, podemos observar que os valores obtidos são significativamente superiores aos obtidos por Costa et al (2008), em todas as classes de antibióticos avaliadas em comum: β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração, quinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas. O mesmo acontece com estudos semelhantes realizados na Europa (SVARM, 2006; Damborg et al., 2008; Wedley et al., 2011) e Canadá (Murphy et al., 2009). Na China (Lei et al., 2010), a prevalência de resistência é substancialmente superior aos resultados obtidos neste estudo.

No caso da resistência às cefalosporinas de terceira geração, a diferença nos valores encontrados pode ser explicada em parte pelo método utilizado, já que foi privilegiado o isolamento de colónias de morfologia compatível com *E. coli* que cresciam junto ao disco de cefotaxima, no agar MacConkey. Também podem ter influência nas diferenças de prevalência observadas outras diferenças nos métodos utilizados, como a interpretação dos diâmetros de zona e a classificação dos isolados com susceptibilidade intermédia, como em Murphy et al. (2009), onde os isolados intermédios foram contabilizados com os resistentes, e em Lei et al. (2010) onde foram contabilizados com os sensíveis.

Como a pressão selectiva exercida pelo uso de antibióticos é considerada o maior propulsor do desenvolvimento e transmissão de resistência, é provável que os animais deste estudo estejam inseridos num ambiente em que essa pressão selectiva é maior. Isto pode dever-se ao uso frequente de antibióticos por parte dos donos e criadores sem aconselhamento veterinário (H. Oliveira, comunicação pessoal, Novembro 10, 2010), ao uso de antibióticos para efeito terapêutico por decisão do médico veterinário, ao consumo de antibióticos por parte dos donos ou de outros animais no agregado e à existência de bactérias resistentes no meio ambiente em que o animal se move.

Podemos considerar que a prevalência de resistência a cada antibiótico é igual ao nível dos isolados e ao nível dos canídeos em estudo, já que foi analisado um isolado por animal. A importância do nível de resistências nos animais deve-se à sua relevância a nível clínico e epidemiológico (Murphy et al., 2009), particularmente quando há multirresistência. Foi encontrada uma prevalência de multirresistência relevante, que pode ter implicações devido à possibilidade de transferência de genes de resistência a bactérias patogénicas. No estudo de Wedley et al. (2011) foi encontrada uma prevalência de multirresistência semelhante. Como a maioria dos antibióticos testados não coincidem com os deste estudo, existe a possibilidade de que se tivesse sido testada a susceptibilidade a um maior número de classes de antibióticos, a frequência de multirresistência que encontraríamos seria superior.

Como era esperado, a grande maioria dos genes de resistência encontrados pelo PCR multiplex β -lactamases são *bla*_{TEM} (Wedley et al., 2011; Féria, Ferreira, Correia, Gonçalves & Caniça, 2002), e foram detectados vários isolados portadores do gene *bla*_{CTX-M} através do PCR CTX-M (Carattoli, Lovari, Franco, Cordaro, Di Matteo & Battisti, 2005; O'Keefe, Hutton, Schifferli & Rankin, 2010; Ewers et al., 2011). Mesmo tratando-se de uma prevalência muito baixa (3,7%), é superior à de outros estudos com uma amostra maior de animais, em que também foram utilizados métodos de rastreio para detecção de ESBLs (Murphy et al., 2009; Wedley et al., 2011). A detecção de bactérias produtoras de ESBL numa população de cães saudáveis pode ser preocupante, particularmente quando não existe nenhum factor de risco identificável. Além disso, só um destes animais não apresentava resistência a outras classes de antibióticos além dos β -lactâmicos, o que representa uma diminuição nas opções terapêuticas disponíveis. Assim, estes isolados têm uma importância clínica ao nível da saúde do animal, mas também podem ter importância ao nível da saúde pública caso haja transferência zoonótica.

Vários estudos estabeleceram uma relação entre o uso de antibióticos e a emergência de resistência a antibióticos (Prescott, Hanna, Reid-Smith & Drost, 2002; Asai et al. 2005; Damborg et al., 2008), mas neste caso, dos cães portadores de bactérias produtoras de ESBL

só um tinha história de exposição a antibióticos no último ano. Por outro lado, a maioria dos animais (63,2%) que tinham tomado algum antibiótico no último ano não apresentavam resistência a nenhum dos antibióticos testados. Outro factor de risco associado à multirresistência e a infecções nosocomiais é a hospitalização (Sanchez et al., 2002; Ogeer-Gyles et al., 2006), e o canídeo C22 presente neste estudo, que vivia em ambiente hospitalar, era portador de *E. coli* produtora de ESBL.

O facto de 24 isolados terem sido negativos a ambos os PCRs efectuados é indicador da presença de outras β -lactamases e/ou de outros mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Nestes, incluem-se alguns isolados resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos estudados, com perfis de resistência Amc-Aml-Ctx-Enr-Fox-Sxt e Amc-Aml-Ctx-Fox. Como apresentam resistência a uma cefalosporina de terceira geração e a uma aminopenicilina associada a um inibidor das β -lactamases, possivelmente são bactérias produtoras de enzimas AmpC ou de carbapenemases. No entanto, é necessário ter em conta que podemos estar perante outras formas de resistência como bombas de efluxo, perda de porinas, alterações nas PLPs, presença de múltiplas, ou mesmo de novas β -lactamases, entre outros (Babic et al., 2006).

Este estudo apresenta como principais limitações o número relativamente reduzido da amostra e o facto de só terem sido colhidas amostras num local. No entanto, os animais que foram incluídos no presente estudo distribuíram-se por treze concelhos diferentes, encontrando-se a maioria a residir no concelho de Sintra. A partir dos dados obtidos, seria interessante aprofundar a análise molecular, procedendo à sequenciação para identificar as enzimas CTX-M, TEM e SHV encontradas e determinar os meios de resistência aos β -lactâmicos nos isolados negativos aos dois PCR. Tal não foi realizado por limitações de tempo. Também se poderia tentar perceber se os donos dos animais com bactérias resistentes estão colonizados com as mesmas bactérias. Ao nível da resistência aos antibióticos CI, poder-se-ia ainda avaliar quais os mecanismos que conferem resistência às fluoroquinolonas.

6. Conclusão

Apesar das limitações deste estudo, os dados obtidos destes canídeos fornecem valores de prevalência de resistência relevantes, substancialmente superiores aos anteriormente encontrados em Portugal. Estes animais representam um reservatório de *E. coli* resistente a antibióticos na comunidade, incluindo *E. coli* produtora de ESBLs, com genes de resistência *bla*_{CTX-M}, que podem representar um risco para a saúde animal e humana. Estes resultados podem servir como ponto de partida para uma investigação mais aprofundada sobre o impacto da resistência a antibióticos em animais de companhia e sobre os mecanismos que conferem essas resistências.

É necessário haver uma sensibilização, tanto da população em geral como dos médicos veterinários, em relação à problemática das resistências e proceder à implementação de um sistema de monitorização que inclua os animais de companhia.

7. Bibliografia

- Ambler, R. P. (1991). A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases. *The Biochemical Journal.*, 276, 269-272.
- Angulo, F. J., Baker, N. L., Olsen, S. J., Anderson, A. & Barrett, T. J. (2004). Antimicrobial Use in Agriculture: Controlling the Transfer of Antimicrobial Resistance to Humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 78-85.
- Apifarma. (2011). *Simposium Veterinário*. Acedido em Abril 5, 2011, disponível em: www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx
- Asai, T., Kojima, A., Harada, K., Ishihara, K., Takahashi, T. & Tamura, Y. (2005). Correlation between the Usage Volume of Veterinary Therapeutic Antimicrobials and Resistance in *Escheria coli* Isolated from the Feces of Food-Producing Animals in Japan. *Japanese. Journal. of Infectious. Disease.*, 58, 369-372.
- Authier, S., Paquette, D., Labrecque, O. & Messier, S. (2006). Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *The Canadian Veterinary Journal*, 47, 774-778.
- Babic, M., Hujer, A. M. & Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9, 142-156.
- Bennett, P. M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 1-4.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 48, 1-14.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933-951.
- Bush, K., Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. (1995). A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 39, 1211-1233.
- Bush, K. (2010). Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 558-564.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P. & Battisti, A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolated from Dogs and Cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 833-835.
- Centeno, M. M. (2010). Influência do Uso de Fluoroquinolonas no Aparecimento de *Escherichia coli* E *Salmonella spp.* multirresistentes em vitelos. *Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

- Chambers, H. F. (2004). β -Lactam Antibiotics & Other Inhibitors of Cell Wall Synthesis. In B. G. Katzung, *Basic Clinical Pharmacology* (9th ed.). (pp. 734-753). Lange - McGraw Hill.
- CLSI. (2006). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S16. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI. (2008). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard - Third Edition. M31-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Costa, D., Poeta, P., Saénz, Y., Coela, A. C., Matos, M., Vinué, L., Rodrigues, J., Torres, C. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, 127, 97-105.
- Couto, N., Pombo, C., Moodley, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of meticillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*, 169, 68-9.
- Damborg, P., Sørensen, A. H. & Guardabassi, L. (2008). Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Veterinary Microbiology*, 132, 190-196.
- DANMAP (2009). *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark*. ISSN 1600-2032
- Drawz, S. M. & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160–201.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 90-103.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I. & Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 3724-3732.
- Ewers, C., Grobbel, M., Bethe, A., Wieler, L. H. & Guenther, S. (2011). Extended-spectrum β -lactamases-producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted! *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 124, 94-101.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H., Guenther, S. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 651–660.
- FAO/WHO/OIE. (2008). Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. *Report of the FAO/WHO/OIE Expert meeting*, FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007.

- Féria, C., Ferreira, E., Correia, J. D., Gonçalves, J. & Caniça, M. (2002). Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 77-85.
- French, G. L. (2005). Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1514-1527.
- Giamarellou, H. (2005). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 1-16.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Cantón, R., Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 1-4.
- Grobbe, M., Lübke-Becker, A., Alesík, E., Schwarz, S., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H. (2007) [abstract]. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 120, 391-401.
- Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 321-332.
- Guardabassi, L., Loeber, M. E. & Jacobson, A. (2004). Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*, 98, 23-27.
- Hawkey, P. M. (2008). Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology*, 153, 406-413.
- Infarmed. (2010). *Prontuário Terapêutico*. Acedido em Abril 5, 2011, disponível em: http://www.infarmed.pt/prontuario/prontuario_terapeutico.pdf
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161-182.
- Jansen, W. T., van der Bruggen, J. T. & Verhoef, J. (2006). Bacterial resistance: A sensitive issue. Complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resistance Updates*, 9, 123-133.
- Johnson, J. K., Perencevich, E. N., Lincalis, D. P. & Venezia, R. A. (2006). Dog Bite Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria to a Human. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27, 762-763.
- Johnson, J. R., Stell, A. L. & Delavari, P. (2001). Canine Feces as a Reservoir of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 1306-1314.
- Johnson, J. R. & Clabots, C. (2006). Sharing of Virulent *Escherichia coli* Clones among Household Members of a Woman with Acute Cystitis. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 101-108.
- Johnson, J. R., Miller, S., Johnston, B., Clabots, C. & DeRoy, C. (2009). Sharing of *Escherichia coli* Sequence Type ST131 and Other Multidrug-Resistant and

Urovirulent *E. coli* Strains among Dogs and Cats within a Household. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 3721–3725.

- Kennedy, K. & Collignon, P. (2010). Colonisation with *Escherichia coli* resistant to “critically important” antibiotics: a high risk for international travellers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 1501–1506.
- Knezevic, P. & Petrovic, O. (2008). Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 360–363.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983) [abstract]. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.*, 11, 315-7.
- Kumarasamy, K. k., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M., Woodford, N., (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10, 597-602.
- Lee, J. H., Bae, I. K. & Lee, S. H. (2010). New Definitions of Extended-Spectrum- β -Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. *Medicinal Research Reviews*, 1-17.
- Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X.-H., Sun, Y.-X., Deng, Y.-T., Sun, Y., Lv, D. H., Wu, C. M., Huang, L. Z., Shen, J. Z., Liu, J. H. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology*, 146, 85-89.
- Levison, M. E. (2009). *β -Lactams*. Merck Sharp & Dohme Corp. Acedido em Abril 6, 2011, de The Merck Manuals: www.merckmanuals.com/professional/sec14/ch170/ch170c.html
- Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S. & Adewoye, L. (2007). β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 121, 197–214.
- Li, X. Z. & Nikaido, H. (2009). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs*, 69, 1555-1623.
- Livermore, D. M. (Outubro de 1995). β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 557–584.
- Lloyd, D. H. (2007). Reservoirs of Antimicrobial Resistance in Pet Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 148–52.
- Lue, T. W., Pantenburg, D. P. & Crawford, P. M. (2008). Impact of the owner-pet and client-veterinarian bond on the care that pets receive. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232, 531-540.

- Maddison, J. E., Watson, A. D. & Elliott, J. (2008). Antibacterial Drugs. In J. E. Maddison, S. W. Page & D. B. Church (Eds.), *Small Animal Clinical Pharmacology* (2nd ed.). (pp. 148-185). Elsevier Limited.
- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y. & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1243-6.
- McDaniels, A. E., Rice, E. W., Reyes, A. L., Johnson, C. H., Raugland, R. A. & Stelma, J. N. (1996). Confirmational Identification of *Escherichia coli*, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate Decarboxylase and β -D-Glucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3350-3354.
- Murphy, C., Reid-Smith, R. J., Prescott, J. F., Bonnett, B. N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J. S., Janecko, N., McEwen, S. A. (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 1047-1053.
- Normand, E. H., Gibson, N. R., Reid, S. W., Carmichael, S. & Taylor, D. J. (2000). Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, 46, 267-278.
- Norrby, R. S., Nord, C. E. & Finch, R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet Infectious Diseases*, 5, 115-119.
- O'Keefe, A., Hutton, T. A., Schifferli, D. M. & Rankin, S. C. (2010). First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the US. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3489-3492.
- Ogeer-Gyles, J., Mathews, K. A., Sears, W., Prescott, J. F., Weese, J. S. & Boerlin, P. (2006) [abstract]. Development of antimicrobial drug resistance in rectal *Escherichia coli* isolates from dogs hospitalized in an intensive care unit. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229, 694-699.
- Okeke, I. N., Lamikanra, A. & Edelman, R. (1999). Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 18-27.
- Passantino, A. (2007). Ethical aspects for veterinarians regarding antimicrobial drug use in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 240-244.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657-686.
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*, 119, 20-8.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. & Bonomo, R. A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 459-469.
- Pomba, C., Mendonça, N., Costa, M., Louro, D., Baptista, B., Ferreira, M., Correia, J. D., Caniça, M. (2006). Improved multiplex PCR method for the rapid detection of β -

lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56, 103–106.

- Pomba, C., da Fonseca, J. D., Baptista, B. C., Correia, J. D. & Martínez-Martínez, L. (2009). Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 327–328.
- Prescott, J. F., Hanna, W. J., Reid-Smith, R. & Drost, K. (2002). Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, 43, 107-116.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (2005). *Microbiology*. (6th ed.). New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 440–458.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2001). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004). *Farmacologia*. (4ª edição) Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Editora Ltda.
- Rice, E. W., Johnson, C. H., Dunnigan, M. E. & Reasoner, D. J. (1993). Rapid Glutamate Decarboxylase Assay for Detection of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4347-4349.
- Rodrigues, J., Thomazini, C. M., Lopes, C. A. & Dantas, L. O. (2004). Concurrent Infection in a Dog and Colonization in a Child with a Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Clone. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1388-1389.
- Sanchez, S., Stevenson, M. A., Hudson, C. R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., et al. (2002). Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3586–3595.
- Sato, Y., Mori, T., Koyama, T. & Nagase, H. (2000). *Salmonella* Virchow Infection in a Infant Transmitted by Household Dogs. *The Journal of. Veterinary and. Medical Science*, 62, 767-769.
- Schjørring, S. & Krogfelt, K. A. (2010). Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. *International Journal of Microbiology*, 2011,1-10.
- Shryock, T. R. & Richwine, A. (2010). The interface between veterinary and human antibiotic use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213, 92-105.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremon, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 1215–1219.
- Stenske, K. A., Bemis, D. A., Gillespie, E. B., D'Souza, D. H., Oliver, S. P., Draughon, F. A., Matteson, K. J., Bartges, J. W., (2009). Comparison of clonal relatedness and

- antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *American Journal of Veterinary Research*, 70, 1108-1116.
- SVARM. (2006). *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring*. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2007. ISSN 1650-6332.
- SVARM. (2009). *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring*. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2010. ISSN 1650-6332.
- SVARM. (2010). *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring*. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2011. ISSN 1650-6332.
- van den Bogaard, A. E. & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335.
- von Baum, H. & Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 503-511.
- Wedley, A. L., Maddox, T. W., Westgarth, C., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Williams, N. J., Dawson, S., (2011). Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Veterinary Record*, 168, doi: 10.1136/vr.d1540
- Weese, J. S. (2008). Antimicrobial resistance in companion animals. *Animal Health Research Reviews*, 9, 169–176.
- Wenzel, R. P. (2004). The Antibiotic Pipeline — Challenges, Costs, and Values. *The New England Journal of Medicine*, 351, 523-526.
- Westgarth, C., Pinchbeck, G. L., Bradshaw, J. W., Dawson, S., Gaskell, R. M. & Christley, R. M. (2008). Dog-human and dog-dog interactions of 260 dog-owning households in a community in Cheshire. *Veterinary Record*, 162, 436-442.
- WHO (2011). *Emergence and Spread of Antimicrobial Resistance*. Acedido em Abril 4, 2011, disponível em: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Emergence_Spread/en/index.html
- WHO (2011). *World Health Day 2011 – Antibiotic resistance: No action today, no cure tomorrow*. Acedido em Abril 3, 2011, disponível em: <http://www.euro.who.int/en/who-we-are/whd/world-health-day-2011-antibiotic-resistance-no-action-today,-no-cure-tomorrow>
- Wolfs, T. F., Duim, B., Geelen, S. P., Rigter, A., Thomson-Carter, F., Fleer, A., et al. (2001). Neonatal Sepsis by *Campylobacter jejuni*: Genetically Proven Transmission from a Household Puppy. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 97-99.

Anexo I - Actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular no Hospital Veterinário da Tapada, entre Outubro e Março de 2010/2011

Introdução:

O estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário da Tapada (HVT) entre 4 de Outubro de 2010 e 31 de Março de 2011, sob orientação do Dr. Hugo Oliveira.

Durante este período foram desenvolvidas uma série de actividades que tiveram como principal objectivo o desenvolvimento do raciocínio crítico científico e aquisição de aptidões nas diversas áreas clínicas: Cirurgia, Imagiologia, Medicina Interna e Internamento de Pequenos Animais.

Descrição das actividades desenvolvidas:

O Hospital Veterinário da Tapada (HVT) localiza-se na Tapada das Mercês, no Concelho de Sintra.

Este hospital oferece serviços de cirurgia, imagiologia (exame radiológico e ecografia) e medicina interna de animais de companhia. O HVT está aberto 24h e dispõe de um internamento de cães e gatos, bem como de doenças infecto-contagiosas. Dispõe também de consulta de animais exóticos.

As horas despendidas em cada serviço encontram-se indicadas na Tabela 1.

No serviço de Medicina Interna foi possível assistir a consultas e ter uma participação activa na anamnese, no exame físico e em determinados procedimentos como: administração de fármacos injectáveis, venopunção para colocação de cateteres, colheita de sangue para análise, limpeza de feridas, execução de pensos, limpezas auriculares, observação com otoscópio, raspagens cutâneas, exame com lâmpada de Wood, observação de esfregaços sanguíneos.

No serviço de internamento foram prestados vários cuidados aos animais internados. Foi dada alimentação aos animais, preparação das jaulas para pacientes no pós-cirúrgico, e feita monitorização do estado geral. O internamento permitiu também a execução de várias técnicas, nomeadamente técnicas de contenção, venopunção para colocação de cateteres, colocação de cateteres intra-ósseos, colocação de sistemas de venoclise, algaliação, toracocenteses, aspiração de medula óssea, colheita de sangue para análise, execução de pensos, limpeza de feridas, lavagens vesicais, enemas, fornecimento de oxigénio, administração de vários tipos de medicação.

No serviço de cirurgia foi possível assistir a vários tipos de cirurgias bem como participar activamente em algumas delas. Além disso foi também possível executar muitas das técnicas

já mencionadas acima. Houve participação na escolha e administração da medicação pré-anestésica, indução anestésica, colocação do tubo endotraqueal e monitorização da anestesia volátil. As tarefas desempenhadas variavam consoante a necessidade do cirurgião, englobando os papéis de anestesista, circulante ou ajudante de cirurgião, muitas vezes na mesma cirurgia. As cirurgias foram bastante variadas e estão descritas na Tabela 3. Após a cirurgia era feito o acompanhamento e monitorização até este se encontrar estável, no internamento. Foi possível participar em várias consultas de acompanhamento pós-cirúrgicas o que permitiu a realização de pensos simples, limpeza de feridas, extracção de pontos e reavaliação de suturas.

No âmbito da imagiologia foi possível assistir e ajudar à realização de exames radiográficos, como radiografias simples, radiografias de trânsito baritado ou mielografias, e de exames ecográficos.

Tabela 1: Número de horas despendidas em cada serviço.

Serviço	Total de horas
Medicina Interna	269
Imagiologia	40
Cirurgia	290
Internamento	294
Total	893

Gráfico 1 - Distribuição do tempo despendido em cada serviço

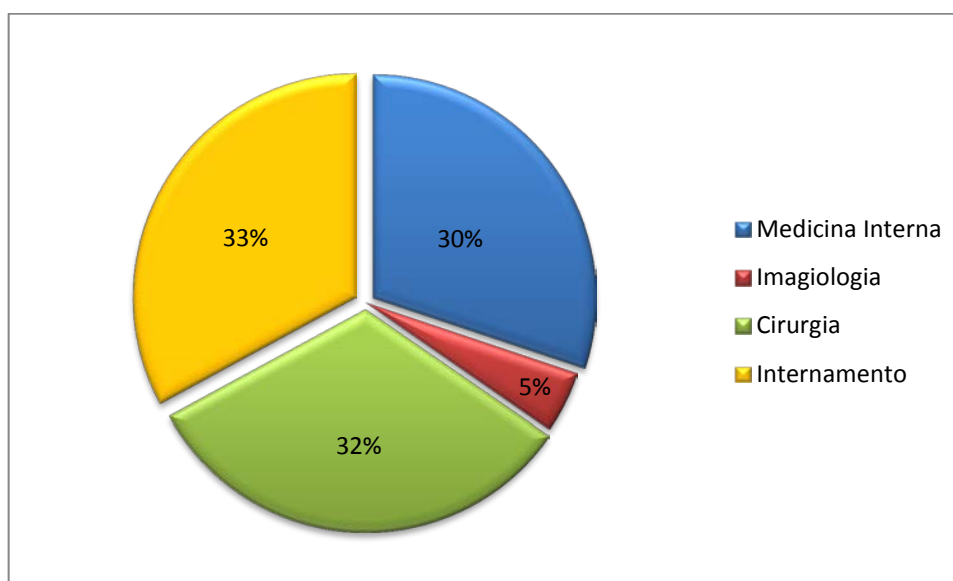


Tabela 2: Resumo da casuística encontrada durante o estágio curricular no HVT.

Área	Espécie	Diagnóstico/ procedimentos	Nº de casos	Nº total de casos
Vacinações	Canídeos	-	35	40
	Felídeos	-	5	
Aparelho Locomotor	Canídeos	Displasia da anca	11	20
		Fractura do(s) membro(s)	6	
	Felídeos	Fractura do(s) membro(s)	4	
Sistema Gastro- Intestinal	Canídeos	Pancreatite	1	43
		Suspeita de doença inflamatória intestinal	3	
		Megaesófago	2	
		Parasitoses	4	
		Gastrite por corpo estranho	2	
		Shunt porto-sistémico intra-hepático	1	
		Necrose da língua por lagarta do pinheiro	6	
		Outros	16	
	Felídeos	Estomatite	3	
		Pancreatite	1	
		Lipidose Hepática	3	
		Obstipação	1	
Sistema Córdio- respiratório	Canídeos	Insuficiência cardíaca	5	9
		Pneumonia	1	
		Colapso da traqueia	1	
	Felídeos	Asma Felina	1	
		Pneumonia	1	
Sistema Nervoso	Canídeos	Hérnia Discal	3	11
		Trauma da coluna vertebral	5	
		Cauda equina	1	

		Neuropatia Periférica	1	
	Felídeos	Intoxicação por piretrinas	1	
Sistema Urinário	Canídeos	Infecção do tracto urinário	4	29
		Insuficiência renal crónica	10	
		Outros	1	
	Felídeos	Insuficiência renal crónica	10	
		Insuficiência renal aguda	1	
		Obstrução uretral	3	
Sistema Reprodutor	Canídeos	Piómetra	6	11
		Mastite	1	
		Outros	1	
	Felídeos	Piómetra	3	
Oncologia	Canídeos	Suspeita de linfoma	2	15
		Suspeita de neoplasia mamária	4	
		Suspeita de tumor da cavidade oral	1	
		Suspeita de neoplasia das glândulas periananaís	1	
	Felídeos	Suspeita de linfoma	1	
		Suspeita de neoplasia mamária	3	
		Suspeita de timoma	3	
Quimioterapia	Canídeos	Linfoma	2	3
	Felídeos	Linfoma	1	
Dermatologia	Canídeos	Dermatite alérgica à picada da pulga	2	23
		Dermatite atópica	2	
		Dermatofitose	1	
		Otites	10	
		Sarna sarcóptica	4	

	Felídeos	Dermatite alérgica	1	
		Dermatofitoses	3	
Oftalmologia	Canídeos	Úlcera da córnea	1	9
		Entrópio	6	
		Queratoconjuntivite seca	1	
		Prolapso da Glândula de Harder	1	
	Felídeos	-	-	-
Doenças Infecciosas	Canídeos	Parvovirose	11	77
		Dirofilariose	1	
		Leptospirose	1	
		Leishmaniose	18	
		Tosse do canil	10	
		Babesiose	6	
		Erlichiose	7	
		Bartonelose	6	
	Felídeos	PIF	3	
		FIV/FeLV	5	
		Anemia Infecciosa Felina	3	
		Coriza	6	
Sistema Endócrino	Canídeos	Diabetes Mellitus	1	5
		Síndrome de Cushing	2	
		Hipotireoidismo	1	
	Felídeos	Diabetes Mellitus	2	
Outros tratamentos e procedimentos	Canídeos	Lavagem auricular	1	144
		Resolução de otohematoma	1	
		Colheita de sangue para análises	20	
		PAAF	4	
		Limpeza de feridas	17	
		Remoção de pontos	20	

		Penso	16	
		Teste de estimulação de ACTH	4	
		Colheita de sémen	5	
		Inseminação	4	
		Colheita de líquido céfalo- raquidiano	2	
		Mielografia	2	
		Raspagem	5	
	Felídeos	Remoção de pontos	10	
		Limpeza de feridas	3	
		Colheita de sangue para análises	11	
		Penso	12	
		Toracocentese	4	
		Sonda esofágica	4	
Traumatologia	Canídeos	Lacerações	2	11
		Politraumatismo	1	
		Mordeduras	7	
	Felídeos	Politraumatismo	1	
Total				450

Tabela 3 – Resumo da casuística referente às intervenções cirúrgicas efectuadas durante o estágio curricular.

Cirurgia	Espécie	Nº de casos	Nº total de casos
Destartarização	Canídeo	4	5
	Felídeo	1	
Extracção de dentes	Canídeo	1	3
	Felídeo	2	
Orquiectomia	Canídeo	14	19
	Felídeo	5	
Ovariohisterectomia	Canídeo	16	26
	Felídeo	10	
Mastectomia total	Canídeo	2	3
	Felídeo	1	
Mastectomia parcial	Canídeo	3	4
	Felídeo	1	
Exérese de nódulos	Canídeo	6	9
	Felídeo	3	
Resolução de fracturas dos membros	Canídeo	5	7
	Felídeo	2	
Osteotomia da cabeça e colo do fémur	Canídeo	6	7
	Felídeo	1	
Cesariana	Canídeo	7	7
	Felídeo	-	
Piometra	Canídeo	6	9
	Felídeo	3	
Inseminação	Canídeo	1	1
Amputação do membro anterior	Canídeo	2	2
Biópsia vesical após cistotomia	Canídeo	1	1

Remoção de corpo estranho intestinal	Canídeo	2	2
Ressecção intestinal e anastomose	Canídeo	1	1
Biópsia intestinal	Canídeo	1	1
Pancreatectomia parcial	Felídeo	1	1
Esplenectomia	Canídeo	1	1
Resolução de hérnia perianal pela técnica de transposição	Canídeo	2	2
Uretrostomia	Felídeo	3	3
Caudectomia	Canídeo	3	3
Amputação de dedo	Canídeo	1	1
Enucleação	Canídeo	3	3
Redução manual de prolapso rectal	Felídeo	1	1
Pericardiectomia	Canídeo	1	1
Total			123

Anexo II - Resumo apresentado no XXI Congresso ECVIM-CA 2011, Sevilha, Espanha

Constança Pomba

From: congress@ecvim-ca.org
Sent: sexta-feira, 15 de Abril de 2011 10:50
To: cpomba@fmv.utl.pt
Subject: Abstract submission



Dear Mrs. Constança Pomba,
You have submitted the following abstract:

Abstract title

Author

Co-author(s)

Society

Keywords

Presentation Preference

Abstract text

Antimicrobial resistance (AMR) among *Escherichia coli* is an increasing global problem in humans and animals. Critically important (CI) antimicrobials are those that meet WHO criteria 1 (sole therapy or one of few alternatives to treat serious human disease) and 2 (used to treat diseases caused by organisms that may be transmitted via non-human sources or that may acquire resistance genes from non-human sources). The aim of this study was to determine the rate of colonization with AMR *E. coli* particularly to 3rd generation cephalosporins (3GC) among healthy dogs. One hundred and forty-two *E. coli* were isolated from dogs (n=151), during 3 months, at a private Hospital in the Lisbon area. The dogs included in the study were healthy with no history of antimicrobial consumption in the previous month. Swabs were inoculated in peptone water and incubated for 18h and then sub-cultured onto MacConkey agar with a 30µg cefotaxime disk. *E. coli* typical colonies were selected from the nearest area around the disk and identified by specific *gadA E. coli* gene PCR. Susceptibility testing and interpretation was performed using the disc diffusion method according to CLSI guidelines. Extended-spectrum-β-lactamases (ESBL) genes were detected by PCR. Full susceptible isolates were 54% (n=76) and 46% had at least one acquired resistance. The resistance rate of *E. coli* for amoxicillin (Aml) was 44%, 31% trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt), 28% amoxicillin/clavulanate (Amc), 27% cefoxitin (Fox), 19% cefotaxime (Cb), 18% enrofloxacin (Enr), and 5% gentamicin (Cn). Multidrug-resistance (MDR) defined by resistance to 3 or more antimicrobial classes was present in 24 isolates (17%). Within the MDR isolates, resistance to CI antimicrobial classes was present in 19 isolates: 13% to 3GC and 15% to enrofloxacin. The most frequent MDR profiles were AmlR-AmcR-EnrR-SxtR-CbR-FoxR (n=10), AmlR-EnrR-SxtR-CbR (n=3) and AmlR-AmcR-EnrR-SxtR-CnR-CbR-FoxR (n=3). Among *E. coli* strains, 27% were cephalosporinases producers (chromosomal or plasmid encoded) and 4% were ESBL-producers (5 harbouring a *bla_{CTX-M}* gene and one a *bla_{TEM}* gene). In this study we showed a high frequency of resistance in animal *E. coli* strains from healthy dogs. Our results demonstrated that multidrug-resistant *E. coli* cephalosporinases and ESBL producing strains are increasing and may compromise effective therapeutic options. Furthermore, resistance to CI antimicrobial classes is relevant. It is of prime importance that the utility of such antibacterial agents should be preserved, as resistance would have an important impact on human health due to the close and direct contact between pets and owners.

Abstract internet id

COLONISATION WITH *ESCHERICHIA COLI* RESISTANT TO "CRITICALLY IMPORTANT" ANTIBIOTICS IN HEALTHY DOGS IN LISBON, PORTUGAL

Prof Pomba, Constança, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, LISBOA, Portugal
(Presenting author)

Salazar, AS, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, LISBOA, Portugal

Belas, A, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, LISBOA, Portugal

Couto, N, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, LISBOA, Portugal

ESVIM - European Society of Veterinary Internal Medicine

critically important antibiotics resistance; dogs

Poster presentation, if accepted oral possible

204

Anexo III - Aprovação do resumo a apresentar no XXI Congresso ECVIM-CA 2011, Sevilha, Espanha.

Constança Pomba

From: Iona Vermeiren [I.vermeiren@pauwelspcu.nl]
Sent: quinta-feira, 23 de Junho de 2011 08:06
To: coombas@fmv.uff.br
Subject: Research Communication ECVIM-CA Congress 2011



23 June 2011

Research Communication ECVIM-CA Congress 2011, Seville, Spain

Dear Dr. Pomba,

It gives the Scientific Committee of the ECVIM-CA Congress 2011 great pleasure to inform you that your research communication has been accepted as a **poster presentation**.

Title:	COLONISATION WITH ESCHERICHIA COLI RESISTANT TO "CRITICALLY IMPORTANT" ANTIBIOTICS IN HEALTHY DOGS IN LISBON, PORTUGAL
Number:	IM-P-14
Society:	ESVIM
Presenting author:	Pomba

Posters should be in **A0 format, and in portrait orientation (84,1 cm width and 118,9 cm length)**. There will be an area in the exhibit hall for all posters – please mount your poster before Thursday 8th September 10:00 am, and do not dismantle it before Saturday 10th September 17:00 pm. You are required to be present at your poster site during the Poster wine and cheese reception on Thursday 8 September from 16:40-17:40, in order to respond to questions from the audience.

Poster research communications from authors aged < 35 years are eligible for an award. The winners will be announced at the farewell party on Saturday 10 September.

Presenting authors of accepted scientific research communications are eligible for a reduced rate of entrance to the scientific programme of the entire congress. Therefore, we would advise you to register for the Congress as soon as possible online at www.ecvimcongress.org. Just to reiterate: you as presenter of an accepted research communication have to register as well.

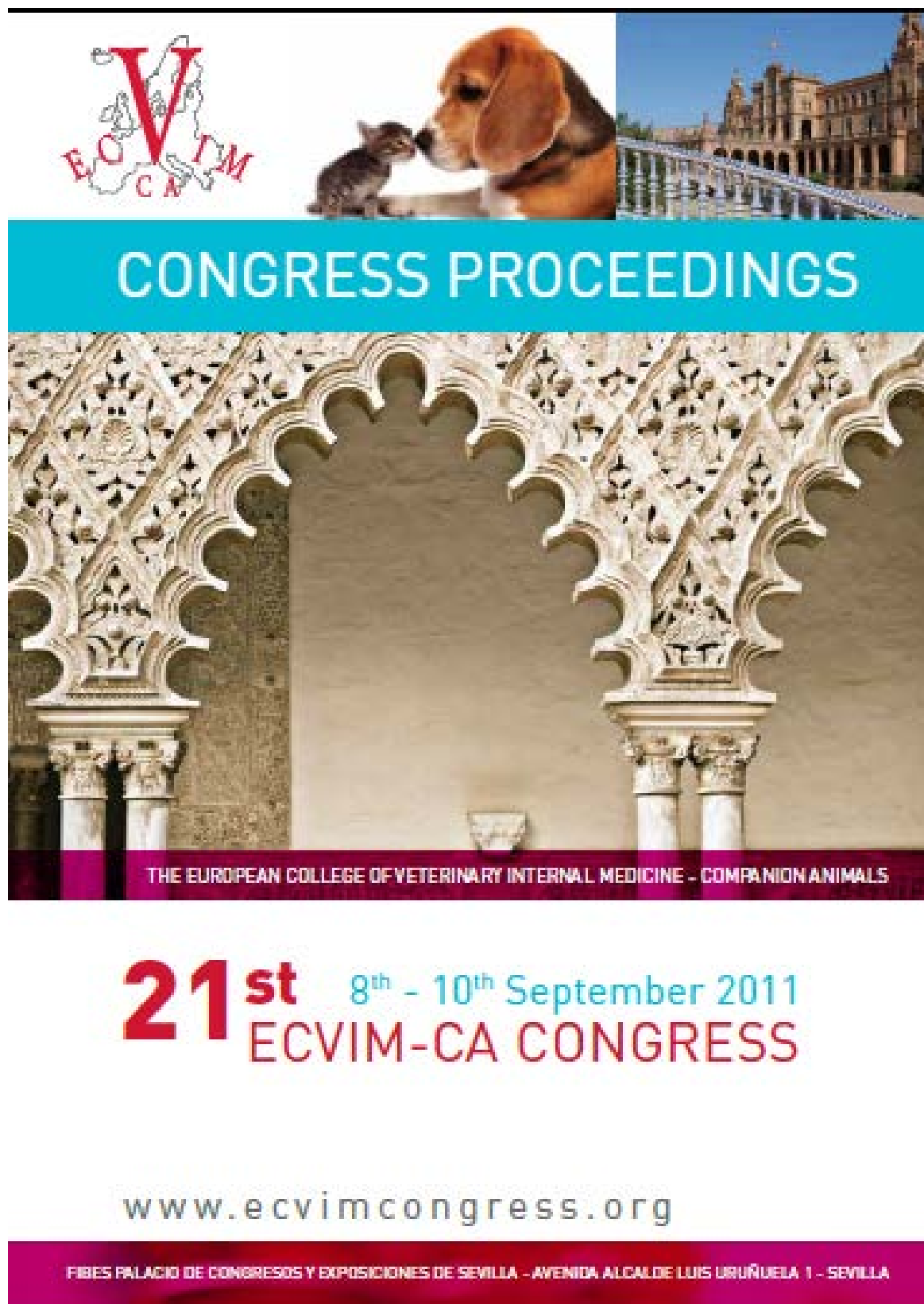
Your research communication will be available in the proceedings book and will be published on the website www.vin.com. We consider this to be an attractive way to disseminate the excellent information from our scientific presentations.

Please inform us as soon as possible (info@ecvimcongress.org) if you are not able to display your poster and to be present for the poster session. Failure to inform us about a cancellation will result in removal of your abstract from the proceedings and may result in you being barred from submitting research communications to future congresses.

We are looking forward to meeting you and reading your research communication in Seville.

Kind regards,

Dr Alex German



total of 11 post mortems conducted, in only 2 cases thrombosis could be detected.

We conclude that in most cases of canine IMHA administration of anticoagulants does not appear to be essential for a positive outcome, and that further studies are necessary to elucidate the role of coagulation in this disease.

POSTER NO. IM-P-14

COLONISATION WITH ESCHERICHIA COLI RESISTANT TO 'CRITICALLY IMPORTANT' ANTIBIOTICS IN HEALTHY DOGS IN LISBON, PORTUGAL

C. Pomba, A.S. Salazar, A. Belas, N. Couto

Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, LISBOA, Portugal

Antimicrobial resistance (AMR) among *Escherichia coli* is an increasing global problem in humans and animals. Critically important (CI) antimicrobials are those that meet WHO criteria 1 (sole therapy or one of few alternatives to treat serious human disease) and 2 (used to treat diseases caused by organisms that may be transmitted via non-human sources or that may acquire resistance genes from non-human sources). The aim of this study was to determine the rate of colonization with AMR *E. coli* particularly to 3rd generation cephalosporins (3GC) among healthy dogs. One hundred and forty-two *E. coli* were isolated from dogs (n=151), during 3 months, at a private Hospital in the Lisbon area. The dogs included in the study were healthy with no history of antimicrobial consumption in the previous month. Swabs were inoculated in peptone water and incubated for 18h and then sub-cultured onto MacConkey agar with a 30µg cefotaxime disk. *E. coli* typical colonies were selected from the nearest area around the disk and identified by specific *gadA* *E. coli* gene PCR. Susceptibility testing and interpretation was performed using the disc diffusion method according to CLSI guidelines. Extended-spectrum-β-lactamases (ESBL) genes were detected by PCR. Full susceptible isolates were 54% (n=76) and 46% had at least one acquired resistance. The resistance rate of *E. coli* for amoxicillin (Ami) was 44%, 31% trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt), 28% amoxicillin/clavulanate (Amc), 27% cefoxitin (Fox), 19% cefotaxime (Cbx), 18% enrofloxacin (Enr), and 5% gentamicin (Cn). Multidrug-resistance (MDR) defined by resistance to 3 or more antimicrobial classes was present in 24 isolates (17%). Within the MDR isolates, resistance to CI antimicrobial classes was present in 19 isolates: 13 % to 3GC and 15% to enrofloxacin. The most frequent MDR profiles were AmIR-AmCR-EnrR-SxtR-CbxR-FoxR (n=10), AmIR-EnrR-SxtR-CbxR (n=3) and AmIR-AmCR-EnrR-SxtR-CnR-CbxR-FoxR (n=3). Among *E. coli* strains, 27% were cephalosporinase producers (chromosomal or plasmid encoded) and 4% were ESBL-producers (5 harbouring a *blaCTX-M* gene and one a *blaTEM* gene). In this study we showed a high frequency of resistance in animal *E. coli* strains from healthy dogs. Our results demonstrated that multidrug-resistant *E. coli* cephalosporinase and ESBL producing strains are increasing and may compromise effective therapeutic options. Furthermore, resistance to CI antimicrobial classes is relevant. It is of prime importance that the utility of such antibacterial agents should be preserved, as resistance would have an important impact on human health due to the close and direct contact between pets and owners.

POSTER NO. IM-P-15

HAPTOGLOBIN CONCENTRATION IN GALGOS ESPAÑOLES (SPANISH GREYHOUND) AND DIFFERENCES WITH CLOSELY RELATED GREYHOUNDS

S. Zaldivar Lopez¹, I. Mesa Sanchez², A. Galan Rodriguez², J.J. Ceron³, S. Martinez-Sublela², M.M. Granados Machuca², G. Couto¹

¹The Ohio State University, COLUMBUS, United States of America

²Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, CORDOBA, Spain, ³Animal Medicine and Surgery, University of Murcia, MURCIA, Spain

In 2009, our group reported that retired racing Greyhounds (G) have low serum haptoglobin (Hp) concentrations when measured by colorimetric and immunoturbidimetric methods; these findings were confirmed by protein electrophoresis (negligible bands in G when compared to the non-Greyhounds, NG) (Couto et al, 2009). Besides phenotypical similarities, G and Galgos Españoles (GE) appear to share common origins and are thus closely related breeds (same breed group and section, according to the Fédération Cynologique Internationale (World Canine Organization)). We hypothesize that the low Hp concentration may be a feature of the sighthound group, and thus GE will have similar Hp concentration than G.

Venous samples were collected from 21 healthy adult GE. After collection, the blood was immediately placed into tubes with EDTA anticoagulant and centrifuged at 1300g for 10 minutes. Plasma was aliquoted and immediately frozen at -80°C, until all the samples were sent as a batch for analysis. Plasma Hp was measured using a hemoglobin-binding method (colorimetric). Statistical significance was set at p<0.05. For statistical purposes, and due to the data availability, we compared the GE results to the historic G and NG groups (n=15 and n=11, respectively). All three groups were analyzed for descriptive statistics and tested for normality using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test, and then the groups were compared using one way ANOVA with post-test (Tukey's multiple comparison test).

The GE group was normally distributed (mean 1.77 g/L, SD 1.41). When compared to G (median 0, inter quartile range -IQR- 0.15) and NG (median 0.68, IQR 1.42) groups, Hp in the GE group was higher than G (p<0.0001) but not statistically different from the NG group. Surprisingly, GE have Hp concentrations similar to those in other dog breeds and within reference interval, but different to their closely related groupmates (G). Hp has two roles: a) is a free Hb scavenger that prevents oxidative damage (and consequent hypertension) and renal dysfunction; and b) has immunomodulatory effects, since it is an acute phase protein (APP). Given the phenotypic similarities between these two sighthound breeds (virtually indistinguishable to the untrained eye), and differences in Hp concentration, the comparison between G and GE is an exceptional natural biological model system to study the physiology of Hp in the canine specie, given that we have access to what appears to be a "naturally knock-down model" (G) and a closely related normal control (GE).

POSTER NO. IM-P-16

HEMOPHILIA A (FACTOR VIII DEFICIENCY) IN A FAMILY OF BELGIAN SHEPHERD MALINOIS DOGS BRED IN ITALY

J. Lubas¹, A. Gavazza¹, M. Caldin²

¹University of Pisa, SAN PIERO A GRADO, PISA, Italy

²San Marco Private Veterinary Clinic, PADUA, Italy

Hemophilia A is the most common and usually severe inherited canine coagulopathy. Diagnosis relies on documenting combinations of prolonged coagulation times (APTT) and reduction in factor VIII activity and/or concentration. Hemophilia A is inherited as an

Anexo V - Inquérito feito aos donos sobre as características dos seus animais de companhia.

Proprietário:_____ Código Amostra:_____

Nome do Paciente:_____ Raça:_____ Idade:_____ Sexo:_____

Zona de residência:

Vive com outros animais? Sim Não

Proveniência? Particular
 Criador
 Associação

Tem acesso à rua? Sim Não

Esteve em algum canil/hotel para cães no último ano? Sim Não

Durante o último ano fez algum antibiótico? Sim Não Não sabe

Se sim, qual?

Qual o motivo?

Esteve internado no último ano? Sim Não Não sabe

Mais do que 2 dias? Sim Não

Qual o motivo?

Motivo da presente consulta:

Anexo VI – Respostas ao inquérito: Caracterização demográfica e meio ambiente.

Código da amostra	Idade^a	Sexo^b	Raça	Residência	Outros animais	Proveniência	Acesso à rua	Canil/hotel
2	3A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
3	1A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
4	2A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Sim
5	6A	M	Papillon	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
6	2A	F	Dogue de Bordéus	Setúbal	Sim	Criador	Sim	Sim
8	2M	F	Boerboel	Sintra	Sim	Criador	Sim	Sim
9	5A	M	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
10	2A	M	Caniche	Sintra	Sim	Particular	Não	Não
11	12A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
12	2A	M	Cão de Água	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
13	9M	F	Shar pei	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
14	3A	F	Cão de Água	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
15	7A	F	Galguinho italiano	Mafra	Sim	Criador	Sim	Não
16	8M	F	Shar pei	Cascais	Sim	Particular	Sim	Sim
17	4A	F	Indeterminada	Lisboa	Sim	Particular	Sim	Não
18	1A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Sim
19	4A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Sim
20	8A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
21	4M	F	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Não	Não
22	2A	M	Yorkshire terrier	Sintra	Sim	Particular	Não	Não
23	2A	F	Pinscher	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
24	6A	F	Japanese chin	Mafra	Sim	Criador	Sim	Não
25	1A	M	Chihuahua	Mafra	Sim	Criador	Sim	Não
26	10A	F	Pastor Alemão	Lisboa	Não	Particular	Sim	Não
27	13A	M	Cão de Água	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
28	5M	M	Shar pei	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
29	8M	M	Cão de Água	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não

30	4A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
31	2M	F	Beagle	Sintra	Sim	Criador	Não	Não
32	1A	F	Caniche	Sintra	Não	Particular	Não	Não
33	5A	M	Pastor Alemão	Mafra	Sim	Particular	Sim	Não
34	7A	F	Golden Retriever	Barreiro	Não	Particular	Sim	Não
35	2A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
36	2A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
37	3A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
38	4M	M	Indeterminada	Oeiras	Sim	Particular	Sim	Não
39	4M	F	Boerboel	Sintra	Sim	Criador	Sim	Sim
40	3A	M	Cão de Água	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
41	8M	M	Cão de Água	Torres Vedras	Não	Particular	Sim	Não
42	6A	F	Caniche	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
43	6M	F	Teckel	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
44	2A	M	Boerboel	Cascais	Sim	Particular	Sim	Sim
45	2A	F	Rotweiler	Cascais	Sim	Particular	Sim	Sim
46	9A	M	Cocker spaniel	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
47	6A	F	Caniche	Sintra	Sim	Associação	Não	Não
48	7A	F	Cocker spaniel	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
49	8M	F	Cão de Água	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
50	1A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
51	1A	F	Podenga	Setúbal	Sim	Criador	Sim	Não
53	13A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
54	7A	M	Cão de Água	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
55	3A	F	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Sim
56	1A	F	Spitz Anão	Lisboa	Não	Associação	Não	Não
57	2A	M	Bichon Frisé	Setúbal	Sim	Criador	Sim	Não
58	10M	M	Grand Basset Vandeem	Santarém	Sim	Criador	Sim	Não
59	10M	F	Grand Basset	Santarém	Sim	Criador	Sim	Não
60	1A	F	Cavalier King Charles	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
61	6A	F	Basenji	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não

62	5M	M	Japanese chin	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
63	3A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
64	13A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
65	1A	F	Bulldog Inglês	Cascais	Sim	Criador	Não	Não
66	3A	F	Podenga	Cascais	Sim	Criador	Sim	Não
67	6A	F	Golden Retriever	Odivelas	Sim	Particular	Sim	Não
68	1A	F	Indeterminada	Odivelas	Sim	Particular	Sim	Não
69	2A	M	Rotweiler	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
70	5A	F	Chihuahua	Lisboa	Não	Particular	Sim	Não
72	1A	F	Cão de Água de Xira	Vila Franca de Xira	Sim	Particular	Sim	Não
73	13A	M	Indeterminada	Amadora	Sim	Particular	Sim	Não
74	5M	M	Boerboel	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
75	5A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
76	3A	M	Pastor Alemão	Cascais	Sim	Criador	Sim	Não
78	3M	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Não	Não
79	4A	F	Beagle Inglês	Cascais	Sim	Particular	Sim	Não
80	7A	F	Golden Retriever	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
81	3A	M	Galgo Afegão	Sintra	Sim	Particular	Sim	Sim
82	13A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Sim
83	2M	M	Pitt Bull	Sintra	Não	Particular	Não	Não
84	3A	F	Dogue Alemão	Sintra	Sim	Particular	Sim	Sim
87	6A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
88	10A	F	Boerboel	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
90	5A	F	Cocker spaniel	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
91	11M	M	Boxer	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
93	6A	M	Indeterminada	Lisboa	Sim	Associação	Sim	Sim
94	3A	F	Rotweiler	Lisboa	Sim	Criador	Sim	Não
95	4A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
96	7A	F	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Não
97	1A	M	Chihuahua	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não

98	5a	m	Rotweiller	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
99	7A	m	Rotweiller	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
100	2M	M	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Não	Não
101	1A	M	Yorkshire terrier	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
102	2A	M	Yorkshire terrier	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
103	3M	M	Shar pei	Lisboa	Sim	Particular	Não	Não
104	4A	M	Cão de Água	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
105	2A	F	Cão de Água	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
106	3A	F	Bulldog Francês	Oeiras	Não	Particular	Sim	Não
107	11A	F	Basset hound	Lisboa	Não	Particular	Sim	Não
108	3D	F	Rotweiller	Sintra	Sim	Criador	Não	Não
109	5A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
110	14A	M	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
111	5A	F	Shih-tzu	Cascais	Sim	Particular	Sim	Não
112	3M	F	Basset hound	Sintra	Sim	Criador	Não	Não
113	1A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
114	3A	F	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
115	1A	M	Indeterminada	Amadora	Não	Particular	Sim	Não
116	11A	F	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
117	4A	M	Chow chow	Cascais	Sim	Criador	Sim	Não
118	6M	F	Chihuahua	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
120	2A	M	Braco Alemão	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
121	2A	F	Chihuahua	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
122	9A	M	Labrador	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
123	1A	F	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Não
124	2A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Não
125	7A	M	Weimereiner	Setúbal	Sim	Criador	sim	Não
126	6M	F	Boxer	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
127	5A	M	Rafeiro Alentejano	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
128	7 M	M	Spitz Alemão	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não

130	5A	F	Caniche	Sintra	Não	Particular	Não	Não
131	3M	M	Shih-tzu	Sintra	Sim	Criador	Não	Não
132	8A	F	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Sim
133	5A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Não
134	2A	M	Indeterminada	Sesimbra	Sim	Associação	Sim	Não
135	9A	F	Wippet	Lisboa	Sim	Criador	Não	Não
136	6A	F	Chihuahua	Lisboa	Sim	Criador	Não	Não
140	3A	F	Boerboel	Cascais	Sim	Particular	Sim	Não
142	14A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
143	4A	M	Indeterminada	Sintra	Não	Particular	Sim	Não
144	4A	F	Cão de Água	Sintra	Sim	Criador	Sim	Não
145	1A	F	Spitz Alemão	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
147	3A	F	Caniche	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
148	5M	F	Spitz Alemão	Arruda-dos-Vinhos	Sim	Criador	Sim	Não
149	5A	M	Indeterminada	Sintra	Sim	Associação	Sim	Não
150	1A	M	Pug	Sintra	Sim	Particular	Sim	Não
151	1A	F	Saluki	Cascais	Sim	Criador	Sim	Não

a: A – Anos, M – meses, D – dias

b: F – Feminino, M - Masculino

Anexo VII - Respostas ao inquérito: Motivo da consulta, antibioterapia prévia e história de internamento prévia.

Código da amostra	Motivo da consulta	AB no último ano	Qual AB?	Qual o motivo do AB?	História de internamento prévia		
					Internad o no último ano?	Mais de 2 dias?	Porquê?
2	Cirurgia electiva	Não sabe			Não sabe		
3	Claudicação	Não			Não		
4	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Castração	Sim	Não	Castração
5	Consulta de rotina	Não			Não		
6	Cirurgia	Não			Não		
8	Procediment o electivo	Não			Não		
9	Claudicação	Não			Não		
10	Procediment o electivo	Não			Não		
11	Colapso	Não			Não		
12	Procediment o electivo	Não			Não		
13	Cirurgia	Não			Não		
14	Cruzamento	Não			Não		
15	Consulta de rotina	Não			Não		
16	Cirurgia	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico; metronidazol	Diarreia	Sim	Sim	Diarreia
17	Procediment o electivo	Não			Não		
18	Claudicação	Não			Não		
19	Consulta de rotina	Não			Não		
20	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Castração	Não		
21	Consulta de rotina	Não			Não		
22	Vive no hospital	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico; metronidazol; cefovecina		Sim	Sim	
23	Vive no hospital	Não			Não		
24	Consulta de rotina	Não			Não		
25	Consulta de rotina	Não			Não		
26	Consulta de rotina	Não			Não		
27	Procediment o electivo	Não			Não		
28	Consulta de rotina	Não			Não		
29	Procediment o electivo	Não			Não		
30	Cirurgia	Não			Não		
31	Consulta de rotina	Não			Não		
32	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Cirurgia de remoção de corpo estranho no intestino	Sim	Sim	Cirurgia de remoção de corpo estranho no intestino

33	Consulta de rotina	Não			Não			
34	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Cirurgia para remoção de nódulos e destarização	Não			
35	Cirurgia electiva	Não sabe			Não sabe			
36	Cirurgia electiva	Não sabe			Não sabe			
37	Cirurgia electiva	Não sabe			Não sabe			
38	Consulta de rotina	Não			Não			
39	Procedimento electivo	Não			Não			
40	Procedimento electivo	Não			Não			
41	Procedimento electivo	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Laceração	Não			
42	Procedimento electivo	Não			Não			
43	Consulta de rotina	Não			Não			
44	Consulta de rotina	Não			Não			
45	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	OVH	Sim	Não	OVH	
46	Procedimento electivo	Não			Não			
47	Cirurgia	Não			Não			
48	Procedimento electivo	Não			Não			
49	Consulta de rotina	Sim	Ceftriaxona; metronidazol	Gastroenterite	Sim	Sim	Gastroenterite	
50	Cirurgia electiva	Não			Não			
51	Cirurgia	Não			Sim	Sim	A aguardar cirurgia	
53	Consulta de rotina	Sim		Fractura do membro anterior	Sim	Sim	Fractura do membro anterior	
54	Férias	Não			Sim	Sim	Férias	
55	Consulta de rotina	Não sabe			Não sabe			
56	Férias	Não			Sim	Sim	Férias	
57	Consulta de rotina	Sim	Metronidazol; ceftriaxona; amoxicilina /ácido clavulânico	Mordida grave	Sim	Sim	Mordida grave	
58	Procedimento electivo	Não			Não			
59	Consulta de rotina	Não			Não			
60	Cirurgia	Não			Não			
61	Consulta de rotina	Não			Não			
62	Consulta de rotina	Não			Não			
63	Cirurgia electiva	Não			Não			
64	Consulta de rotina	Não			Sim	Sim	Observação	
65	Consulta de rotina	Não			Sim	Não		
66	Consulta de rotina	Não			Não			
67	Consulta de rotina	Não			Não			

68	Consulta de rotina	Não			Não		
69	Consulta de rotina	Não			Não		
70	Consulta de rotina	Não			Não		
72	Consulta de rotina	Não			Não		
73	Consulta de rotina	Sim	Ceftriaxona; amoxicilina /ácido clavulânico	Cirurgia	Não		
74	Procediment o electivo	Não			Não		
75	Cirurgia	Sim	Ceftriaxona	Cirurgia para remoção de lipoma	Sim	Sim	Cirurgia para remoção de lipoma
76	Consulta	Não			Sim	Não	Observação
78	Consulta de rotina	Não			Não		
79	Consulta de rotina	Não			Não		
80	Consulta de rotina	Não			Não		
81	Consulta de rotina	Não			Não		
82	Consulta de rotina	Não			Não		
83	Consulta de rotina	Não			Não		
84	Consulta de rotina	Não			Não		
87	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico; enrofloxacina; azitromicina; cloranfenicol	Rinite por <i>Pasteurella canis</i>	Sim	Sim	Extracção de dentes
88	Consulta de rotina	Não			Não		
90	Consulta de rotina	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Gastrite	Sim	Sim	Igual à anterior
91	Cirurgia	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Ressecção da cabeça do fémur	Sim	Sim	Ressecção da cabeça do fémur
93	Consulta de rotina	Não			Não		
94	Cirurgia	Não			Não		
95	Cirurgia electiva	Não sabe			Não sabe		
96	Cirurgia electiva	Não			Não		
97	Procediment o electivo	Não			Não		
98	Consulta de rotina	Não			Não		
99	Consulta de rotina	não sabe			Não		
100	Consulta de rotina	Não			Não		
101	Procediment o electivo	Sim	Cloranfenicol	Conjuntivite	Não		
102	Procediment o electivo	Não			Não		
103	Procediment o electivo	Não			Não		
104	Procediment o electivo	Não			Não		
105	Procediment o electivo	Não			Não		
106	Cirurgia ortopédica	Não			Não		

107	Problema neurológico	Não			Sim	Sim	Hérnia Discal
108	Procedimento electivo	Não			Não		
109	Procedimento electivo	Não			Não		
110	Consulta de rotina	Não			Não		
111	Procedimento electivo	Não			Não		
112	Consulta de rotina	Não			Não		
113	Consulta de rotina	Não			Não		
114	Consulta de rotina	Não			Não		
115	Consulta	não			Não		
116	Consulta	Não			Não		
117	Cirurgia	Não			Não		
118	Consulta de rotina	Não			Não		
120	Consulta de rotina	Não			Não		
121	Consulta	Não			Não		
122	Consulta de rotina	Não			Sim	Sim	Prostração devido a artroses
123	Consulta	Não			Não		
124	Cirurgia electiva	Não			Não		
125	Consulta	Não			Não		
126	Cirurgia electiva	Sim	Amoxicilina /ácido clavulânico	Tosse	Não		
127	Procedimento electivo	Não			Não		
128	Consulta de rotina	Não			Não		
130	Consulta de rotina	Não			Não		
131	Consulta de rotina	Não			Não		
132	Consulta de rotina	Não			Não		
133	Cirurgia de rotina	Não			Não		
134	Cirurgia electiva	Não			Não		
135	Consulta de rotina	Não			Não		
136	Consulta de rotina	Não			Não		
140	Consulta	Não			Sim	Sim	Observação
142	Consulta	Não			Não		
143	Consulta de rotina	Não			Não		
144	Consulta (eco)	Não			Não		
145	Consulta	Não			Não		
147	Cirurgia (enucleação)	Não			Não		
148	Cirurgia ortopédica	Não			Não		
149	Cirurgia ortopédica	Não			Não		
150	Patologia	Sim	Amoxicilina /ácido	Corpo estranho na	Não	Não	

	ortopédica	clavulânico; metronidazol	pata	
151	Consulta de rotina	Não		Não

Anexo VIII - Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de *E. coli*.

Código da amostra	Amc	Aml	Enr	Sxt	Cn	Ctx	Fox
C2	S	S	S	S	S	S	S
C3	S	S	S	S	S	S	S
C4	S	S	S	S	S	S	S
C5	S	S	S	S	S	S	S
C6	R	R	R	R	S	R	I
C8	S	S	S	S	S	S	S
C9	S	S	S	S	S	S	S
C10	S	S	S	S	S	S	S
C11	R	R	I	R	S	S	R
C12	S	S	S	S	S	S	S
C13	R	R	S	R	S	S	R
C14	S	S	S	S	S	S	S
C15	R	R	S	S	S	S	R
C16	R	R	R	R	S	R	R
C17	R	R	I	S	S	I	R
C18	S	S	S	S	S	S	S
C19	R	R	S	R	S	S	S
C20	R	R	R	R	R	R	R
C21	S	S	S	S	S	S	S
C22	R	R	R	S	S	I	R
C23	R	R	I	R	R	R	S
C24	S	S	S	S	S	S	S
C25	S	S	S	S	S	S	S
C26	S	S	S	S	S	S	S
C27	S	S	S	S	S	S	S
C28	S	S	S	S	S	S	S
C29	S	S	S	S	S	S	S
C30	S	S	S	S	S	S	S
C31	S	R	S	S	S	S	S
C32	S	S	S	S	S	S	S
C33	S	S	S	R	S	S	S
C34	R	R	R	R	S	R	R
C35	S	S	S	S	S	S	S
C36	R	R	R	R	S	R	R
C37	S	I	S	S	S	S	S
C38	S	S	S	S	S	S	S
C39	I	R	R	R	I	R	S
C40	S	I	S	S	S	S	S

C41	R	R	S	S	S	R	R
C42	S	R	S	S	S	S	S
C43	S	I	S	S	S	S	S
C44	S	I	S	S	S	S	S
C45	S	I	S	S	S	S	S
C46	S	R	R	R	S	I	S
C47	S	S	S	S	S	S	S
C48	S	S	S	S	S	S	S
C49	S	S	S	S	S	S	S
C50	S	S	S	S	S	S	S
C51	S	S	S	S	S	S	S
C53	S	S	S	S	S	S	S
C54	S	R	S	S	S	S	S
C55	R	R	R	R	S	R	R
C56	I	R	R	R	S	R	R
C57	R	R	R	R	S	R	R
C58	S	S	S	S	S	S	S
C59	S	S	S	S	I	S	S
C60	S	R	S	R	I	S	S
C61	S	S	S	S	S	S	S
C62	S	S	S	S	S	S	S
C63	R	R	S	S	S	R	R
C64	S	S	S	S	S	S	S
C65	S	S	S	S	S	S	S
C66	S	S	S	S	S	S	S
C67	S	S	S	S	S	S	S
C68	S	S	S	S	S	S	S
C69	S	S	S	S	S	S	S
C70	S	S	S	S	S	S	S
C72	S	S	S	S	S	S	S
C73	S	S	S	S	S	S	S
C74	S	S	S	S	S	S	S
C75	S	S	S	S	S	S	S
C76	S	R	S	R	S	S	S
C78	S	S	S	S	S	S	S
C79	S	S	S	S	S	S	S
C80	S	S	S	S	S	S	S
C81	S	S	S	S	S	S	S
C82	S	R	S	I	S	S	S
C83	S	S	S	S	S	S	S
C84	I	R	S	R	S	S	S
C87	R	R	R	R	I	I	R
C88	S	S	S	S	S	S	S
C90	S	R	R	R	S	R	R
C91	S	S	S	S	S	S	S

C93	S	S	S	S	S	S	S
C94	R	R	R	R	S	R	R
C95	R	R	R	R	R	R	R
C96	R	R	S	S	S	R	R
C97	S	R	S	R	I	S	S
C98	S	S	S	S	S	S	S
C99	S	S	S	S	S	S	S
C100	S	S	S	S	S	S	S
C101	R	R	S	S	S	S	R
C102	S	S	S	S	S	S	S
C103	S	R	S	R	I	S	S
C104	R	R	R	R	R	I	R
C105	R	R	R	R	R	I	R
C106	S	R	S	S	S	S	S
C107	S	S	S	S	S	S	S
C108	S	S	S	S	S	S	S
C109	R	R	R	R	S	R	R
C110	S	R	I	R	S	R	S
C111	S	S	S	S	S	S	S
C112	R	R	R	R	S	I	R
C113	S	S	S	S	S	S	S
C114	S	S	S	S	S	S	S
C115	I	R	R	R	S	R	S
C116	R	R	S	S	S	S	R
C117	S	S	S	S	S	S	S
C118	S	S	S	S	S	S	S
C120	S	S	S	S	S	S	S
C121	R	R	S	R	I	I	R
C122	S	S	S	S	S	S	S
C123	R	R	S	S	I	I	R
C124	S	R	S	I	S	R	S
C125	I	R	S	S	S	S	R
C126	R	R	R	R	I	R	R
C127	S	S	S	S	S	S	S
C128	S	S	S	R	S	S	S
C130	R	R	S	R	S	I	R
C131	S	R	S	R	S	S	S
C132	R	R	S	S	S	I	R
C133	R	R	R	S	S	R	R
C134	S	S	S	S	S	S	S
C135	S	S	S	S	S	S	S
C136	R	R	S	S	S	I	R
C140	R	R	S	R	S	R	R
C142	S	S	S	S	S	S	S
C143	S	S	S	S	S	S	S

C144	S	S	S	S	S	S	S
C145	S	R	S	R	R	S	S
C147	S	R	S	R	I	S	S
C148	S	R	S	R	S	S	I
C149	S	R	S	R	I	S	S
C150	S	R	S	S	S	S	S
C151	S	S	S	S	S	S	S